

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivrée par le
**Centre international d'études
supérieures en sciences agronomiques
Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale
SIBAGHE
Et de l'Unité Mixte de Recherche AGAP du CIRAD

Spécialité : Biologie Intégrative des Plantes

Présentée par :
Jihène BEN YAHMED

**Etude des propriétés de tolérance au déficit
hydrique et au stress salin de géotypes
appartenant au genre *Poncirus* et au groupe
des mandariniers**

Soutenue le 20 décembre 2013
devant le jury composé de

M. Raphael **MORILLON**, HDR-Dr, Cirad
M. Jean-Louis **JULIEN**, Professeur, Université Blaise Pascal
M. Jean-Philippe **GALAUD**, Maître de Conférences, Université Toulouse III
M. Jean Luc **REGNARD**, Professeur, Montpellier Sup Agro
M. Mehdi **BEN MIMOUN**, Enseignant Chercheur, INAT

Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier en premier lieu **le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique de Tunisie** de m'avoir accordé cette bourse de thèse.

Je remercie également le **Cirad** de m'avoir accueilli au sein de l'équipe APMV de l'UMR AGAP.

Je remercie tous les laboratoires de l'**IVIA** de m'avoir aidé dans l'accomplissement ce travail.

Je voudrais remercier les membres du **jury Mr. GALAUD, Mr. JULIEN, Mr. REGNARD et Mr. BEN MIMOUN** pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier mon encadrant le **Dr. Raphaël Morillon** d'avoir accepté de diriger cette thèse. Je lui suis reconnaissante pour le temps qu'il m'a accordé. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour son support, sa confiance, sa patience et ses encouragements permanents.

J'exprime mes sincères remerciements au **Dr. François Luro** pour son aide, ces conseils et sa disponibilité pour l'accomplissement de ce travail.

J'exprime ma gratitude au **Dr. Mehdi Ben Mimoun** de m'avoir recommandée pour cette thèse. Je vous remercie de m'avoir accordé cette opportunité.

J'exprime mes sincères remerciements au **Dr. Patrick Ollitrault**.

Je tiens à remercier, tout particulièrement le **Dr. Manuel Talon** de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et m'avoir accueilli chaleureusement dans son unité.

Je remercie aussi le **Dr. Alexandra Salvador** de m'avoir accueillie au sein du groupe post récolte.

Un très grand merci, plein d'amour, à **Isabel Sanchez Talon** pour m'avoir aidé dans l'accomplissement de cette thèse.

Je souhaite remercier **Madame Frédérique Ollitrault** pour son aide précieuse.

Un grand merci à mes chers amis **Tahise Magalhaes de Oliveira** et **Pedro Novillo** pour tout ce qu'ils m'ont appris et surtout pour leur permanente disponibilité.

Je tiens à remercier **Frank Curk** et **Andres Garcia-Lor** pour leur aide dans mon travail.

Je remercie aussi **Marie Angeles Forner** et **Anna Quinones** pour leur aide.

Je remercie aussi tout le groupe de « Genomica » : **Angel, Mati, Chris, Elena, Concha, Quico et Toni**.

Je tiens à remercier **Madame Martine Barraud, Madame Margaret Paul et Madame Joëlle Lopez** pour leur aide précieuse.

Pour finir, je remercie ma famille et mes ami(e)s pour le support moral et les encouragements qu'ils m'ont fournis durant la durée de ma thèse

RÉSUMÉ

L'agrumiculture mondiale est tributaire de l'utilisation de porte-greffes conférant une meilleure adaptation aux contraintes biotiques et abiotiques et assurant une production de qualité. Les orangers trifoliés (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) ainsi que leurs hybrides sont couramment utilisés comme porte-greffes en raison de leur immunité envers le virus de la Tristeza, alors que les génotypes du genre *Citrus*, comme les mandariniers, sont utilisés pour conférer des tolérances au stress abiotiques (calcaire, salinité). La diversité du genre *Poncirus* semble peu importante et l'évaluation d'une certaine variabilité des comportements dans les conditions de stress abiotique sont très restreintes. Chez les mandariniers, les mandariniers acides sont souvent utilisés comme porte-greffes ou comme géniteurs de porte-greffes. Les mandariniers doux sont, quant à eux, exploités dans les programmes de création de variétés productrices sans pour autant connaître leurs niveaux de tolérance aux stress abiotiques.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié la tolérance au déficit hydrique et au stress salin de génotypes représentatifs d'une part de la diversité des *Poncirus* et des mandariniers.

A partir de l'analyse de la diversité génétique des 74 accessions de *Poncirus* de la collection INRA-CIRAD de San Giuliano révélée par marquage SSR et par le phénotype de taille des graines, des feuilles et des fleurs, nous avons établi une classification en 4 groupes génétiques dont un correspondant aux tétraploïdes. Puis sur une sélection d'accessions de ces différents groupes, nous avons étudié la physiologie de ces plants soumis à un déficit hydrique. Dans une autre expérience, nous avons caractérisé les propriétés de tolérance au stress salin de 16 accessions de mandariniers sélectionnés parmi les différents groupes de diversité moléculaire. Cette étude a été conduite sur des plants cultivés sur leurs racines et sur des rameaux sectionnés soumis au stress salin et pour lesquels plusieurs paramètres physiologiques (photosynthèse, conductance stomatique...) et biochimiques (dosage des chlorures et des activités du système antioxydant...) ont été mesurés. Dans l'expérience sur les *Poncirus*, la diversité s'organise essentiellement autour de deux groupes génétiques clairement distincts au niveau moléculaire et aussi morphologique. A l'intérieur de chaque groupe, la diversité ne résulterait que de la mutation ou de la variation ploïdique. De plus, les génotypes appartenant au groupe génétique 1 (appelé « grande fleur ») sont relativement plus sensibles au déficit hydrique que les génotypes du groupe 2 (appelé « petite fleur »). Dans l'expérience du stress salin sur les mandariniers, la tolérance est de même nature quelle que soit la classification « doux »/« acide » de la variété. Il semble néanmoins que les mandariniers ayant hérité des portions de génomes de *C. maxima* ou de *Papeda* présentent une meilleure tolérance à la salinité. L'expérimentation sur rameaux isolés permet d'étudier directement les réactions cellulaires au niveau foliaire en contournant l'effet racinaire sur l'absorption des sels. Ainsi nous avons observé de la tolérance chez les variétés ayant de fortes concentrations foliaires en Cl^- . L'implication de mécanismes spécifiques pouvant expliquer la meilleure tolérance est également discutée. A partir de ces trois expérimentations présentées sous forme de trois articles, une sélection de génotypes est proposée pour qu'ils soient utilisés dans les programmes d'amélioration.

Mots clé : *Poncirus trifoliata*, mandariniers, porte-greffe, diversité génétique, marqueurs moléculaires, déficit hydrique, stress salin, physiologie.

ABSTRACT

World citriculture is dependent on the use of rootstock, transmitting to the cultivated variety a better adaptation to biotic and abiotic stress and ensuring quality production. Trifoliolate oranges (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) and their hybrids are commonly used as a rootstock because of their immunity to the tristeza virus while genotypes from the genus *Citrus*, such as mandarins, are used to confer tolerance to abiotic stresses (limestone, salinity). *Poncirus* genus diversity seems to be less important and the evaluation of some behavioral variability when subjected to abiotic stress conditions is very limited. For the mandarin group, acid mandarins are often used as rootstock or as a parent rootstock. Sweet mandarins are, on the other side, exploited in varieties breeding programs for fruit quality without knowing their levels of tolerance to abiotic stress.

In this thesis, we studied water deficit and salt stress tolerance for genotypes that are representatives of the diversity for mandarin group and *Poncirus*.

From the analysis of the genetic diversity of 74 accessions of *Poncirus* from the INRA - CIRAD germoplasm of San Giuliano (revealed by SSR markers and phenotypes: size of seeds, leaves and flowers), we have established a classification into four genetic groups with one that corresponds to the tetraploid group. Then, using a selection of accessions within these groups, we studied the physiology of seedlings subjected to a water deficit. In another experiment, we characterized the properties of salt stress tolerance of 16 mandarin accessions selected from the different groups based on the molecular diversity. This study was performed on seedlings grown on their roots and on twigs sectioned and subjected to salt stress and for which several physiological parameters (photosynthesis, stomatal conductance...) and biochemical (determination of chloride content and activities of antioxidant enzymes...) were measured. For the *Poncirus* genus, diversity is primarily organized around two clearly distinct genetic groups at molecular and morphological level. Within each group, the diversity could be only the result of a mutation or a ploidy variation. Furthermore, the study of *Poncirus* showed that genotypes belonging to genetic group 1 (called "large flower") are relatively more sensitive to water deficit than genotypes of group 2 (called "small flower"). In the salt stress experiment on mandarins, the tolerance is similar regardless of the "sweet"/"acid" variety classification. However, it seems that the mandarins who inherited portions of genomes of *C. maxima* or *Papeda* have better tolerance to salinity. Isolated twigs experiment allows us to study directly the cellular responses at leaf level and to bypass the effect of the root on salt absorption. Therefore, we observed tolerance among varieties such as high leaf concentration of Cl⁻. The involvement of specific mechanisms that could explain the increased tolerance is also discussed. From these three experiments presented as three journal articles, a selection of genotypes is proposed in order to be used in future breeding programs.

Keywords: *Poncirus trifoliata*, mandarins, rootstock, genetic diversity, molecular markers, water deficit, salt stress, physiology.

TABLE DES MATIERES

PARTIE 1 : Synthèse bibliographique.....	1
I. Problématique de l'agriculture dans le monde.....	2
1. Salinité.....	2
2. Sécheresse.....	3
II. Les agrumes : taxonomie et diversité génétique.....	4
III. Diversité génétique et phénotypique au sein du genre <i>Citrus</i>	5
IV. Diversité génétique et phénotypique au sein du genre <i>Poncirus</i>	6
V. Diversité génétique et phénotypique au sein du groupe des mandariniers.....	7
VI. Lien entre diversité, adaptation aux contraintes abiotiques et amélioration génétique des espèces.....	9
VII. Polyembryonie et polyploïdie chez les agrumes.....	10
1. Polyembryonie chez les agrumes.....	10
2. Polyploïdie chez les agrumes.....	10
3. Impact de la polyploïdie sur l'adaptation des agrumes aux contraintes environnementales.....	11
VIII. Les principaux porte-greffes d'agrumes.....	13
1. Intérêt de l'utilisation et de l'amélioration des porte-greffes.....	13
2. Les principaux porte-greffes des agrumes.....	13
a. Le bigaradier (<i>C. aurantium</i>).....	13
b. Le mandarinier Cléopâtre (<i>C. reshni</i>).....	14
c. Le <i>Poncirus trifoliata</i>	14
d. Les Citranges.....	14
e. Volkameriana (<i>Citrus volkameriana</i> Pasquale).....	14
f. Citrumelos (<i>Citrus</i> × <i>paradisi</i> × <i>Poncirus trifoliata</i>).....	15
g. Le limettier Rangpur (<i>Citrus limonia</i> , Osbeck).....	15
IX. Création variétale chez les porte-greffes.....	17
X. Stress hydrique et stress salin chez les plantes.....	18
1. Déficit hydrique.....	21
a. Fermeture stomatique : implication de l'acide abscissique (ABA).....	22
i. Rôle de l'ABA dans la signalisation du stress de la racine vers la feuille.....	22
ii. Voie de biosynthèse de l'ABA.....	23
iii. L'ABA : l'hormone de stress.....	25
iv. L'ABA et la fermeture stomatique.....	25
v. Signalisation du stress hydrique au niveau des cellules de gardes.....	26
b. Maintien de la balance hydrique par ajustement osmotique.....	28
i. Ajustement osmotique des cellules.....	28
ii. Modification de l'expression génique induite par stress osmotique.....	29
iii. Facteurs de transcription de la réponse stomatique à la sécheresse.....	31
iv. Transduction du signal.....	31
2. Stress salin.....	32
a. Effets d'un stress salin au niveau de la plante.....	32
b. Salinité et expression génique.....	35
c. Mécanismes de tolérance à la salinité chez les agrumes.....	36
i. Compartimentation intracellulaire.....	39
ii. Exclusion racinaire.....	40
XI. Stress Oxydatif.....	41
1. Les catégories d'EOA.....	44
a. Dérivés non radicalaires.....	44
b. Radicaux libres oxygénés.....	45
2. Toxicité des EOA.....	45
a. Oxydation des protéines.....	46

	b. Oxydation des acides nucléiques.....	46
	c. Peroxydation des acides gras polyinsaturés	47
XII.	Les systèmes antioxydants.....	47
1.	Effet du stress abiotique sur le système de défense oxydatif.....	48
2.	Régulation de l'expression des gènes responsables de la tolérance au stress.....	49
3.	Système de défense enzymatique.....	50
i.	<i>Super oxyde dimustase (SOD)</i>	50
ii.	<i>Catalase (CAT)</i>	52
iii.	<i>Glutathion réductase (GR)</i>	53
iv.	<i>Ascorbate peroxydase (APX)</i>	53
v.	<i>Glutathion peroxydase (GPX)</i>	54
vi.	<i>Les Peroxydase</i>	55
vii.	<i>Glutathion S Transferase (GST)</i>	55
4.	Système de défense non enzymatique : les molécules antioxydantes.....	55
i.	<i>Le glutathion et l'ascorbate</i>	56
ii.	<i>La proline</i>	57
iii.	<i>Le Tocophérol</i>	57
iv.	<i>Les caroténoïdes</i>	57
v.	<i>Les flavonoïdes</i>	58
XIII.	Problématique scientifique et objectifs.....	58
	PARTIE 2 : Matériel et méthodes	61
I.	Matériel végétal.....	62
1.	Etude de la diversité au sein du genre <i>Poncirus</i> (<i>Poncirus trifoliata</i> Raf.) : caractérisation moléculaire et évaluation des propriétés de tolérance au déficit hydrique.....	62
a.	Analyse de la diversité génétique et phénotypique des génotypes appartenant au genre <i>Poncirus</i>	62
b.	Caractérisation de la tolérance au déficit hydrique de génotypes <i>Poncirus</i> représentatifs de la diversité.....	62
2.	Caractérisation de la tolérance au stress salin de 16 accessions représentatives de la diversité existante au sein du groupe des mandariniers.....	62
3.	Etude des propriétés de tolérance au stress salin de rameaux isolés de mandariniers : une nouvelle méthode pour caractériser la tolérance au sel des variétés.....	63
II.	Dispositifs expérimentaux.....	64
1.	Caractérisation de la tolérance au déficit hydrique des génotypes <i>Poncirus trifoliata</i> liés à la diversité.....	64
a.	Analyse de la diversité génétique et phénotypique des génotypes appartenant au genre <i>Poncirus</i>	64
i.	<i>Analyse de la diversité génétique</i>	65
ii.	<i>Analyse de la diversité phénotypique: surface foliaire, taille des fleurs et des graines</i>	65
iii.	<i>Variabilité de la production de la Clémentine en fonction de l'origine génétique du porte-greffes Poncirus</i>	65
b.	Etude du comportement de génotypes <i>Poncirus</i> appartenant aux deux groupes génétiques identifiés vis-à-vis d'un déficit hydrique	65
2.	Caractérisation de la tolérance au stress salin chez des mandariniers représentatifs de la diversité existante au sein du groupe des mandariniers.....	66
3.	Caractérisation de la tolérance au stress salin de génotypes mandariniers à partir d'expériences réalisées sur des rameaux isolés.....	67
III.	Mesures physiologiques	67
1.	Détermination du nombre des feuilles, de la surface foliaire et de la taille des fleurs.....	67
2.	Mesure de la consommation d'eau des plantes : perte en eau des pots et potentiel hydrique du sol.....	67
3.	Mesure de la pression osmotique des feuilles	68
4.	Mesure de la photosynthèse, de la conductance stomatique, de l'efficacité intrinsèque de l'utilisation de l'eau, de la fluorescence du PSII et de la teneur en azote	68
5.	Mesure de la surface et la densité des stomates	69
6.	Mesure de la hauteur des plants.....	69
IV.	Mesures biochimique	69
1.	Identification des plants tétraploïdes et des plants zygotiques.....	69

2.	Détermination de la concentration de la proline foliaire.....	70
3.	Mesure de la teneur en chlorures foliaire et racinaire	70
4.	Mesure de la teneur du sodium foliaire.....	70
5.	Dosage des enzymes antioxydantes	71
i.	Dosage de la catalase et de la peroxydase.....	71
ii.	Dosage de la superoxyde dimustase.....	71
6.	Détermination du taux du peroxyde d'hydrogène.....	71
PARTIE 3 : Résultats et discussion.....		73
<u>Chapitre 1</u> : Etude de la diversité au sein du genre <i>Poncirus</i> (<i>Poncirus trifoliata</i> Raf.) : caractérisation moléculaire et évaluation des propriétés de tolérance au déficit hydrique.....		74
<u>Chapitre 2</u> : Caractérisation de la tolérance au stress salin de 16 accessions représentatives de la diversité existante au sein du groupe des mandariniers.....		108
<u>Chapitre 3</u> : Etude des propriétés de tolérance au stress salin de rameaux isolés de mandariniers : une nouvelle méthode pour caractériser la tolérance au sel des variétés.....		142
Conclusion générale et perspectives.....		170
PARTIE 4 : Références bibliographiques.....		178

ABREVIATIONS

A : Photosynthèse
AAO: Arabidopsis aldehyde oxidase
ABA : Acide abscissique
ADN : Acide désoxyribonucléique
AFLP : Polymorphisme des fragments d'ADN amplifiés (Amplified Fragment Length Polymorphism)
APX : Ascorbate peroxydase
ASA : **Acrylonitrile-styrène-ester acrylique**
cAPX : APX chloroplastique
CAT : Catalase
CTV : Virus de la tristezza des agrumes (*Citrus tristezza virus*)
DTT : Dithiothreitol
DHA : Dihydroxyacétone
EOA : Espèces actives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species = ROS)
GIEC : Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
GPX : Glutathion peroxydase
GR : Glutathion réductase
GS : Glutamine synthase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
gs: Conductance stomatique
GSSG : Glutathione disulfide
GST : Glutathion S-transférase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HR: Humidité relative
HS: Hybridation somatique
ICVN: International citrus variety numbering
InDel: Insertion/délétion
ISSR: Inter Simple Sequence Repeat
LEA: Late Embryogenesis Abundant
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MPK : Mitogen protein kinase
MDA : Malondialdéhyde
MDHA : Monodéhydroascorbate
MDHAR : Monodéhydroascorbate réductase
NaCl: Chlorure de Sodium
NADP⁺: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT : Bleu de nitrotetrazolium
O₂^{•-}: Anion superoxyde
O₂ : Dioxygène
¹O₂ : Oxygène singulet
OH[•] : Radical hydroxyle
P5CS : D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase
POD : PerOxydase Dimutase
PVPP : polyvinylpyrrolidone
RAPD : Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (Random Amplification Polymorphic DNA)
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriction Fragment Length polymorphisme)
RT-qPCR : PCR quantitative en temps réel
SCAR: Région amplifiée à séquence connue (Sequence Characterized Amplified Region)
SNP: Polymorphisme Simple Base (Single-nucleotide polymorphism)
SOD : Superoxyde dismutase
SOS: Salt Overly Sensitive
SRA: Sequence Read Archive
SSR: Répétitions de séquences simples ou microsatellites (Simple Sequence Repeats)
TCA: Acide trichloroacétique
UNCTAD: Conférence des Nations Unies sur le commerce et le développement
UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
USDA: United States Department of Agriculture
USDA-ARS: United States Department of Agriculture -Agricultural Research Service

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX DE L'INTRODUCTION

FIGURES :

Figure 1 : Evolution de 1900 à 2005 de l'index utilisé pour évaluer l'état de sécheresse d'une région, l'index Palmer (PDSI : Palmer Drough Severity Index) (Pachauri et Reisinger, 2007).

Figure 2: Sous-famille des Aurantioideae (Swingle, 1967)

Figure 3 : Relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Citrus* (Garcia-Lor, 2012)

Figure 4: Diversité chez les *Poncirus* (Fang, 1997)

Figure 5: Comparaison entre polyploïdes et diploïdes en condition de stress (Deng et al., 2012)

Figure 6 : Schéma récapitulatif de la réponse à un déficit hydrique (Laloi, 2010)

Figure 7: Réponses stomatiques induites par la sécheresse (Li et Assmann, 2010)

Figure 8 : Effet du stress hydrique et de la salinité sur les plantes (Ben Yahmed, 2013)

Figure 9: Schéma récapitulatif des voies métaboliques de l'ABA (Finkelstein et Rock, 2002).

Figure 10: Illustration schématique de la signalisation de l'ABA pour la fermeture des stomates (Rock et al., 2010)

Figure 11: Temps de réponse pour l'induction des mécanismes de réponse au déficit hydrique (Laloi, 2010)

Figure 12: Voies de signalisations impliquée dans la réponse au stress abiotiques (Panjabi-Sabharwal et al., 2010)

Figure 13: Stratégies d'adaptation au stress salin (Ben Yahmed, 2013)

Figure 14: Délimitation fonctionnelle des voies de signalisation au stress (Li et Assmann, 2010)

Figure 15: Equilibre entre les EOA et le système antioxydant (Gill et Tuteja, 2010)

Figure 16: Perturbation de la photo-respiration et production des EOA (Laloi, 2010)

Figure 17: Production des EOA (Gill et Tuteja, 2010)

Figure 18: Rôle du stress abiotique dans la production accrue des EOA à l'origine des dommages oxydatifs (Nagarajan et Nagarajan 2010)

Figure 19: Système de défense antioxydant : les composants enzymatiques et non enzymatiques (Joseph et Jini, 2011)

Figure 20: Les EOA et les systèmes enzymatiques antioxydants (Gill et Tuteja, 2010)

Figure 21: Stress et systèmes antioxydants (Laloi, 2010)

Figure 22: Rôle de la glutathion réductase (Gill et Tuteja, 2010)

Figure 23: Récapitulatif des réactions antioxydantes (Rock et al., 2010).

Figure 24: Rôle du la glutathion dans le métabolisme de la plante (Gill et Tuteja, 2010)

Figure 25: Fixation des EOA par les caroténoïdes (Laloi, 2010)

TABLEAUX :

Tableau 1: Sols affectés par la salinité dans les continents et subcontinents (Hardy, 2004)

Tableau 2: Caractéristiques des principaux porte-greffes des agrumes (Hardy, 2004)

Tableau 3 : Rôle des enzymes de détoxification (Gill et Tuteja, 2010)

Tableau 4 : Les différentes SOD et leur localisation dans la cellule (Gill et Tuteja, 2010)

Synthèse bibliographique

I. Problématique de l'agriculture dans le monde

Les agrumes représentent le groupe de fruits le plus important du commerce international. La production annuelle totale d'agrumes s'est élevée à 123 millions de tonnes sur la période 2009-2010. Les oranges constituent la majeure partie de la production d'agrumes avec environ 55% de celle-ci (UNCTAD, 2013). Les agrumes sont cultivés sous les climats tropicaux et subtropicaux et peuvent être cultivés dans une zone s'étendant de 40° au Nord à 40° au Sud de l'équateur. La culture des agrumes est confrontée à des contraintes biotiques et abiotiques croissantes dans les principales régions de production. La tristeza (maladie de dégénérescence provoquée par le *Citrus tristeza virus*, CTV), le Phytophthora et les nématodes sont présents aujourd'hui dans la quasi-totalité de l'aire de culture. D'autres contraintes ont, en revanche, un caractère régional : le froid et le Blight (maladie de dégénérescence d'origine encore indéterminée) aux Etats-Unis, la chlorose variéguee des agrumes due à *Xylella fastidiosa*, au Brésil, la Cercosporiose provoquée par *Phaeoramularia angolensis*, en Afrique, le Greening, ou citrus Huanglongbing, en Asie, en Afrique du sud et en Amérique. Parmi les contraintes abiotiques, la salinité et les sols calcaires sont les problèmes majeurs du bassin méditerranéen. La pratique quasi généralisée de la culture de plants greffés sur des porte-greffes permet, dans une certaine mesure, de répondre aux contraintes liées aux sols (calcaire, salinité, parasitisme tellurique) et à la Tristeza. La sélection des scions repose, quant à elle, sur des aspects qualitatifs et, dans certains pays, sur des caractères de tolérance à la Chlorose variéguee des agrumes ou à la Cercosporiose (Ollitrault et Luro, 1997).

1. Salinité

Dans certaines régions, les cultures agricoles sont limitées par l'accumulation de sels dans les sols. Ces quantités excessives de sels, le plus souvent de chlorure de sodium (NaCl), auront des effets néfastes sur la croissance et la productivité des plantes (Reynolds et al., 2005 ; Zilli et al., 2008 ; Sobhanian et al., 2010).

De vastes zones de terres, autrefois arables, sont chaque année retirées de la production agricole en raison de l'augmentation de la salinité du sol (Tableau 1). L'utilisation d'eau d'irrigation présentant des taux élevés de sel et l'application d'engrais contenant du sel constituent les principaux facteurs responsables de l'augmentation de la salinité des sols (Epstein et al., 1980). Le sel est à l'origine de la dégradation de plus de 40 millions d'hectares de terres irriguées, soit plus d'un tiers des terres cultivables dans le monde (Norlyn et Epstein, 1984).

Tableau 1 : Sols affectés par la salinité dans les continents et subcontinents (Hardy, 2004)

Continents	Surface (millions /ha)
Amérique du Nord	15.7
Mexique et Amérique Centrale	2
Amérique de Sud	129.2
Afrique	80.5
Asie du Sud	87.6
Asie de Nord et Asie centrale	211.7
Asie de Sud-Est	20
Australie	357.3
Europe	50.8
Total	954.8

2. Sècheresse

Les régions sèches dans le monde sont représentées par les zones à climat semi-aride, aride ou désertique. Ces zones couvrent environ 37% de la surface des continents (Figure 1). Elles se caractérisent par des précipitations annuelles comprises entre 300 et 600 mm pour les zones semi-arides, entre 100 et 300 mm pour les zones arides alors qu'elles ne dépassent pas 100 mm pour les zones désertiques. Dans le bassin méditerranéen, les précipitations sont très irrégulières et sont concentrées en hiver tandis que les étés sont longs, chauds et secs. Les conditions climatiques associées à la succession des années de sécheresse ont entraîné la raréfaction des ressources en eau dans ces régions.

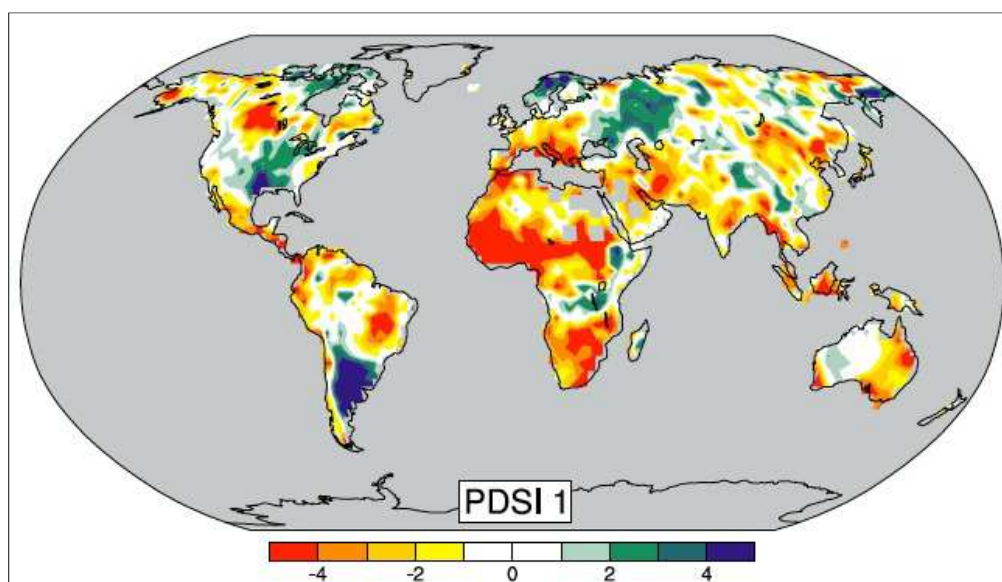


Figure1 : Evolution de 1900 à 2005 de l'index utilisé pour évaluer l'état de sécheresse d'une région, l'index Palmer (PDSI : Palmer Drought Severity Index). Le sol des régions en jaune et rouge s'est asséché, le sol des régions en bleu et vert est devenu plus humide (Pachauri et Reisinger, 2007).

II. Les agrumes : taxonomie et diversité génétique

La terminologie « agrumes » regroupe les espèces du genre *Citrus* associées à deux genres voisins *Fortunella* et *Poncirus*. Les espèces de ces trois genres sont sexuellement compatibles. Le terme « agrumes » est employé aussi bien pour désigner les arbres que leurs fruits. Les genres *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella* appartiennent à la famille des *Rutaceae*, à la sous-famille des *Aurantioideae*, à la tribu des *Citreae* et à la sous-tribu des *Citrinae* (Swingle, 1967) (Figure 2). En général, les agrumes proviennent des régions tropicales et subtropicales du Sud-est de l'Asie et se sont ensuite propagés à d'autres continents (Webber, 1967; Calabrese, 1992).

La taxonomie du genre *Citrus* est complexe et controversée, en raison principalement d'une compatibilité sexuelle entre espèces et genres, de la polyembryonie qui fixe et reproduit les génotypes maternels. Plusieurs études ont été réalisées sur les relations existantes entre les différents genres et espèces d'agrumes. Les critères de classification étaient principalement basés sur les caractéristiques morphologiques. De nombreux systèmes de classification ont été établis parmi lesquels ceux de Swingle (1943) et Tanaka (1977). Ces deux auteurs ont présenté deux concepts différents de classification. Swingle n'a pu définir que 16 espèces de *Citrus* alors que Tanaka a pu identifier 156 espèces. Les analyses phylogénétiques établies par Scora (1975) et Barrett et Rhodes (1976) ont suggéré qu'il n'y avait que 3 véritables espèces au sein du genre *Citrus*, soit les cédratiers (*Citrus medica* L.), mandariniers (*C. reticulata* Blanco) et pamplemoussiers (*C. grandis* (L.) Osb.) (Figure 3). En 1988, Scora a mis en évidence l'existence d'une autre espèce vraie: *C. halimii* Stone. Ces auteurs considèrent les autres génotypes comme des hybrides dérivés des espèces vraies.

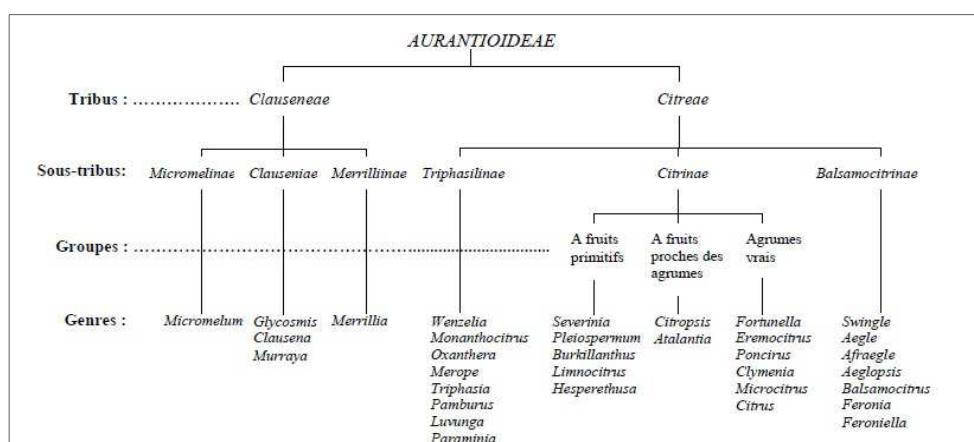


Figure 2: Sous-famille des Aurantinoideae (Swingle, 1967)

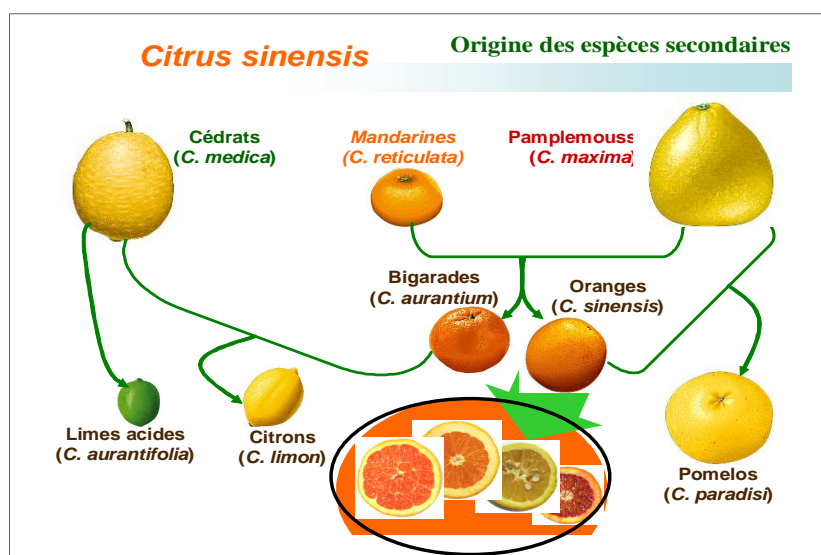


Figure 3 : Relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Citrus*
(Garcia-Lor et al., 2012)

III. Diversité génétique et phénotypique au sein du genre *Citrus*

La taxonomie des agrumes est longtemps restée un sujet à controverse entre taxonomistes. Le développement d'outils biochimiques et moléculaires a donné une nouvelle image phylogénétique des agrumes.. Les résultats sont confirmés par de nombreux travaux conduits à l'aide de marqueurs isozymes (Torres et al., 1978) et RAPD (Luro et al., 1992). Le génome du mandarinier est également présent dans celui du citronnier, du pomelo et d'autres espèces mineures provenant d'hybridations (Barkley et al., 2006; Federici et al., 1998).

Les analyses réalisées par Nicolosi et al. (2000) a classé le *C. micrantha* comme quatrième taxon de base du genre *Citrus* en plus des mandariniers, pamplemoussiers et cédratiers et qui serait le parent maternel du limettier (*C. aurantifolia*). Cette étude a été réalisée au moyen de plus de 262 marqueurs RAPD et 14 marqueurs SCAR. Les résultats obtenus montrent que les cédratiers et les mandariniers sont les ancêtres du Rough lemon et du limettier Rangpur mais ces derniers ne seraient pas des parents directs. L'étude a également pu mettre en évidence que le mandarinier 'King' ne serait pas un vrai mandarinier pur puisqu'il porte des marqueurs de pamplemoussier (5 allèles soit 11.5%) que l'on retrouve soit chez l'oranger doux (4 allèles) ou soit chez l'oranger amère (1 allèle).

Les études d'hérédité cytoplasmique (hérédité maternelle) montrent une prédominance du parent pamplemoussier chez les espèces secondaires cultivées tandis que la contribution

cytoplasmiques des mandariniers chez les espèces secondaires est beaucoup plus limitée. (Nicolosi et al., 2000 ; Bayer et al., 2009 ; Froelicher et al., 2011).

IV. Diversité génétique et phénotypique au sein du genre *Poncirus*

Le genre *Poncirus* est originaire du nord de la Chine, et pendant longtemps, il a été considéré comme monotypique (se dit d'un genre ne comportant qu'un seul sous-taxon immédiatement subordonné ; par exemple, un genre ne correspondant qu'à une seule espèce) : *P. trifoliata*. Cependant, une nouvelle espèce, *P. polyandra*, a été décrite dans le Yunnan (en Chine) en 1980 (Ding et al., 1984). *Poncirus trifoliata* est la seule espèce d'agrumes présentant des feuilles caduques. Les génotypes appartenant à ce genre sont généralement très tolérants au froid et résistants à plusieurs pathogènes d'agrumes comme le CTV, les *Phytophthora* spp. et les nématodes. Les *Poncirus* sont une ressource importante de matériel génétique en tant que porte-greffe pour la culture des agrumes.

Fang et al. (1997) ont étudié 48 introductions de *P. trifoliata* conservées dans la collection de l'USDA à Riverside aux États-Unis (Figure 4). Cette étude a été réalisée à l'aide de différents marqueurs moléculaires [isozymes, RFLP et ISSR]. Peu de polymorphisme a pu être détecté par les marqueurs RFLP et isozymes. Les marqueurs ISSR ont révélé une structure de la diversité organisée autour de 2 groupes principaux recouvrant la grande majorité des accessions. Ces deux groupes peuvent aussi être distingués par la taille des fleurs. Seuls les marqueurs ISSR dominants sont capables de distinguer la différence entre accessions au sein de chaque groupe. Cette étude comme celles de Barkley et al. (2006) et de Uzun et al. (2009) soulignent surtout la faible diversité de ce genre comparativement à celle de *Citrus*. On peut conclure que les collections occidentales sont essentiellement constituées de variétés de ces deux groupes génétiques et pourraient donc ne pas être représentatives de la diversité réellement existante de *P. trifoliata* dans sa zone d'origine. Une autre hypothèse de cette faible diversité pourrait être due à une diversification reposant majoritairement sur la mutation et l'apomixie au détriment de reproduction sexuée.

En général, les *Poncirus* sont des taxons à reproduction apomictiques facultatifs, dont les fruits présentent des teneurs élevées en caroténoïdes et une période de floraison assez précoce comparativement au genre *Fortunella*. Les arbres présentent des épines longues, grosses et épaisses à l'aisselle des feuilles. Les fleurs sont globuleuses avec 5 sépales, 5 pétales et plusieurs étamines courbées vers l'extérieur dès la base de l'ovaire. Les fruits sont pubescents, formés de 8-13 carpelles soudées et ayant une saveur amère. Les pépins sont globuleux de surface rugueuse et polyembryonnés (Espinosa-Nunez et al., 2011).

Des études réalisées sur l'effet du porte-greffes sur la variété ont permis de mettre en évidence que le Poncirus 'Flying Dragon' permet de réduire la vigueur du scion de plus de 47% par rapport à d'autres porte-greffes tel que le limetier Rangpur. En condition non irriguée, le Poncirus 'Flying Dragon' permet de maintenir des rendements relativement élevés. Ces caractéristiques font que ce dernier est bien adapté à des cultures à haute densité (Espinosa-Nunez et al., 2011).

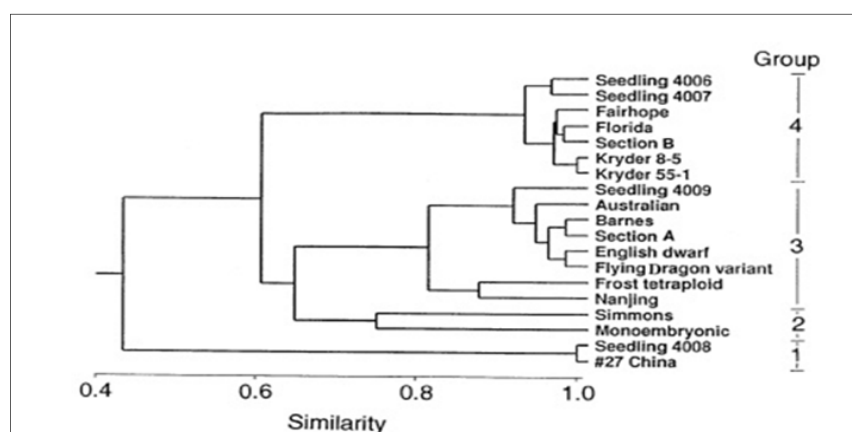


Figure 4 : Diversité chez les *Poncirus* (Fang ,1997)

V. Diversité génétique et phénotypique au sein du groupe des mandariniers

La taxonomie des mandariniers est relativement complexe, due à de nombreuses hybridations et à la présence d'apomixie. La première classification des mandariniers, établie par Webber (1943), suggère que les principaux mandariniers peuvent être classés en 4 groupes : 'King', 'Satsuma', Mandarine et Tangerine. En 1954, Tanaka a pu classer 36 espèces en 5 groupes taxonomiques après avoir revisité la taxonomie, élevé de nombreux mandariniers et certains hybrides de mandariniers au rang d'espèces. Le groupe I regroupe les principales espèces *C. nobilis* Lour. (Cultivars King), *C. unshiu* Marc. (Cultivars 'Satsuma'), et *C. yatsushiro* Hort. ex Tanaka. Le groupe II regroupe les espèces ayant une faible importance économique (*C. keraji* Hort. ex Tanaka, *C. oto* Hort. ex Yuichiro, et *C. toragayo* Hort. ex Yuichiro). Le groupe III comporte les 4 espèces importantes économiquement *C. reticulata* ('Ponkan'), *C. deliciosa* (Willow leaf ou Méditerranéenne), *C. clementina* ('Clementine'), et *C. tangerina* ('Dancy'). Les espèces représentatives du 4^{ème} groupe incluent *C. reshni* ('Cleopatra'), *C. sunki* Hort ex Tanaka ('Sunki'), *C. tachibana* (Mak.) Tanaka. Et finalement, le 5ème groupe comporte des espèces telles que *C. depressa* ('Shekwasha') et *C. lycopersicaeformis*. En 1967, Swingle et Reece ont revisité la taxonomie et ont classé

l'ensemble des mandariniers en une seule espèce *C. reticulata* Blanco. En 1997 et 2008, Mabberley a modifié la taxonomie des *Citrus* et apparentés, mais a conservé la classification établie par Swingle et Reece pour les mandariniers (*C. reticulata*).

Le développement des outils de caractérisation biochimiques et moléculaires a apporté de nouvelles informations. Au moyen de marqueurs moléculaires, il a été montré que les mandariniers sont proches les uns des autres. Torres et al. (1978) ont observé de faibles niveaux de polymorphisme sur 33 génotypes de mandariniers. Les différences de taille de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (Handa et al., 1986), mais également les différences observées pour plus d'une dizaine d'autres systèmes enzymatiques (Ashari et al., 1989) suggèrent que les espèces de mandariniers comprennent plusieurs hybrides. De même, la classification établie par Saunt en 1990 suggère que le groupe des mandariniers ou groupe de « petits agrumes » se répartit en 3 classes: *C. deliciosa* qui correspond au mandarinier commun; *C. unshiu* représenté par les satsumas et *C. reticulata* qui regroupe un grand nombre de variétés dont certaines sont des hybrides de mandariniers alors que d'autres sont issues de croisements entre mandariniers et d'autres espèces. Luro et al. (1995) ont montré que 'Dancy' et 'Ponkan' sont génétiquement proches. Contrairement à la grande variabilité phénotypique observée entre les variétés de mandariniers, les marqueurs moléculaires ISSR ont révélé une similarité génétique importante. Contrairement à cela, l'analyse de marqueurs RAPD réalisée par Coletta Filho et al. (1998) mais également l'analyse des 24 marqueurs moléculaires SSR par Barkley et al. (2006) sur 105 génotypes de mandariniers ont mis en évidence que le groupe des mandariniers constitue une espèce unique *C. reticulata* Blanco. Barkley et al. (2006) considèrent que la variation génétique du groupe mandarinier (*C. reticulata*) est due essentiellement à des hybridations sexuées entre un grand nombre d'espèces ou d'hybrides interspécifiques. Ces mêmes auteurs considèrent, à titre d'exemple, que les génotypes 'Sunki', 'Cléopâtre' et 'Shekwasha' font partie d'un même sous-groupe vu qu'ils sont caractérisés par des petits fruits, des petites fleurs ainsi que des petites feuilles. Enfin, d'autres auteurs ont admis que les mandariniers 'Cléopâtre' et 'Willow leaf' sont classés dans différents sous-groupes avec une différenciation relativement élevée (Ollitrault et al., 2012b).

L'étude de Garcia-Lor et al. (2012) réalisée au moyen de marqueurs nucléaires SNP, SSR et InDel sur 44 génotypes d'agrumes montre l'existence de neuf gènes présentant des polymorphismes SNP entre *C. reticulata* et les autres taxons. Cela pourrait être à l'origine des changements dans la composition en acides aminés expliquant la différenciation phénotypique entre ces génotypes. En revanche, au sein des *C. reticulata*, aucun changement n'a été trouvé

(uniquement un changement d'hétérozygotie pour le cultivar 'Ponkan'). En outre, l'analyse fonctionnelle des différents allèles du gène PSY (gène responsable de la production du phytoène : premier produit de la voie de la production des caroténoïdes) montre que l'expression de ce gène est une étape majeure dans la différenciation entre les taxons de base.

Les études réalisées par Froelicher et al. (2011) ont permis de mettre en évidence que l'ensemble des mandariniers présentent un même mitotype à l'exception des mandariniers 'Cléopâtre', 'Shekwasha', 'Sunki' et 'Nasnaran'. L'étude des marqueurs nucléaires SNP décrit le groupe formé essentiellement par des mandariniers acides, incluant 'Cléopâtre', 'Shekwasha' et 'Sunki', comme génétiquement différent du reste des mandariniers (Ollitrault et al., 2012a). Le mandarinier 'Nasnaran' présente un mitotype « *micrantha* » et serait le résultat de croisement entre mandarinier et *Papeda*.

Plus récemment, les résultats obtenus par Garcia-Lor et al. (2013b) au moyen de marqueurs moléculaires, sur un plus grand nombre de génotypes, montrent qu'il n'est pas adéquat de classer les mandariniers en acides et doux dans la mesure où plusieurs génotypes doux feraient partie du groupe des mandariniers acides. Cette étude a consisté à l'analyse des marqueurs nucléaires (50 SSR et 24 InDel) de 223 génotypes de mandariniers. De cette étude il ressort que *C. nobilis* est un tangor dont le statut d'hybride mandarinier avait été suggéré par d'autres travaux (Coleta-Filho et al., 1998 ; Nicolosi et al., 2000 ; Garcia-Lor et al., 2012a). Cinq groupes de mandariniers ancestraux ont été définis à partir de l'analyse du germoplasme des mandariniers (Groupe 1: *C. reticulata*, groupe 2: *C. deliciosa*, groupe 3: *C. tangerina*, groupe 4: *C. unshiu*, groupe 5: petits mandariniers). Deux groupes d'hybrides additionnels ont été décrits, celui de Ampefy, Wallent et Gailang et celui de tangor 'King'.

VI. Lien entre diversité, adaptation aux contraintes abiotiques et amélioration génétique des espèces

Les sources de tolérance au stress salin les plus importantes ont été observées chez les *Citrus* et principalement dans deux des espèces fondamentales : les mandariniers et les pamplemoussiers. Les espèces et les cultivars tels que le citronnier et le pomelo, dont l'origine génétique est liée aux pamplemoussiers et aux mandariniers, ont hérité de la tolérance parentale vis-à-vis du stress salin. Les génotypes appartenant aussi au sous genre *Papeda* sont tolérants au stress (Ollitrault et al., 2000). Les mandariniers acides ('Cléopâtre', 'Sunki' et 'Shekwaska'), utilisés comme porte-greffes, semblent présenter une bonne adaptation à certaines contraintes abiotiques et biotiques (Ollitrault et al., 2003, Gimeno et al., 2009). Les

analyses de Nicolosi et al. (2000), Froelicher et al. (2011) et Ollitraut et al. (2012) mettent en évidence que ces mandariniers présentent des liens de parenté avec *C. limonia* (qui inclut le limettier Rangpur et le citronnier Volkameriana) ainsi que le *C. jambhiri*, ce qui pourrait peut-être expliquer pour partie leur meilleure adaptation à la sécheresse et à la salinité. En effet, 'Cléopâtre', 'Sunki' et 'Shekwasha' pourraient être les géniteurs maternels des limettiers Rangpur et Rough lemon. Les traits de tolérance pour l'ensemble des stress abiotiques connus chez les limettiers Rangpur et Rough lemon et le citronnier Volkameriana proviennent du génome nucléaire des mandariniers 'Cléopâtre' et 'Shekwasha' (Nicolosi et al., 2000).

VII. Polyembryonie et polyploïdie chez les agrumes

1. Polyembryonie chez les agrumes

La polyembryonie est un phénomène très fréquent chez les agrumes. Lors de la germination, les graines peuvent donner plusieurs plantules. Les embryons des graines polyembryonnées peuvent avoir deux origines différentes :

- L'embryon zygotique : issu de la fécondation d'un gamète mâle et d'un gamète femelle. Une moitié de son patrimoine génétique proviendra du père et l'autre de la mère.
- Le ou les embryons nucellaires : proviennent du développement d'une cellule de nucelle, qui est le tissu nourricier de l'ovaire. Ces embryons auront un profil génétique identique au pied mère.

Si des génotypes polyembryonnés sont utilisés pour les croisements comme parent femelle, plusieurs jeunes plants nucellaires similaires au plant mère sont produits avec très peu ou pas d'hybrides. La polyembryonie est alors une contrainte pour l'amélioration par voie sexuée. Elle permet cependant d'obtenir des jeunes plants sains (exempts de virus et autres pathogènes) avec un génotype identique au plant-mère (même si celui-ci est infecté). Toutefois, l'amélioration des agrumes par voie de sélection nucellaire prend beaucoup de temps en raison d'une phase juvénile très longue, et d'une pleine production tardive (Nicotra, 2001).

2. Polyploïdie chez les agrumes

Les agrumes présentent un nombre de chromosomes égal à 18 ($2n = 18$). Les agrumes sont, en général, diploïdes mais il existe quelques polyploïdes naturels. Les tétraploïdes apparaissent suite au doublement chromosomique des cellules des embryons nucellaires. Par contre, les triploïdes sont causés par la fécondation d'un gamète femelle non réduit et d'un gamète mâle haploïde et inversement. Ils peuvent être aussi le produit de la fécondation entre des plantes diploïdes et tétraploïdes. Les tétraploïdes produisent des fruits à peau épaisse et

irrégulière et les rendements sont généralement plus faibles que ceux de leurs homologues diploïdes.

L'obtention et la sélection d'hybrides est conditionnée par l'hétérozygotie, qui entraîne une forte variabilité des caractères dans la descendance, par l'embryonie nucellaire qui limite le développement des embryons zygotiques, et par la longue phase juvénile (de non-reproduction) qui empêche la sélection phénotypique des jeunes plants avant qu'ils n'aient atteint l'âge de 5-7 ans. Les meilleurs résultats d'hybridation des espèces d'agrumes ont été obtenus par croisement artificiel contrôlé de mandariniers. L'hybridation destinée à créer des hybrides triploïdes est une méthode prometteuse pour la production de variétés sans pépin dans les programmes d'amélioration des agrumes. En fait, les gamètes mâles et les gamètes femelles des génotypes triploïdes sont stériles à cause de la distorsion des chromosomes. Les hybrides triploïdes peuvent être produits en croisant des parents femelles tétraploïdes et des parents mâles diploïdes. Néanmoins, par ce type de croisement, seuls quelques hybrides et de nombreux jeunes plants nucellaires sont produits, en raison du niveau élevé de la polyembryonie des parents femelles tétraploïdes disponibles. Au contraire, si des génotypes diploïdes zygotiques monoembryonnés sont utilisés comme parent femelle et des génotypes tétraploïdes comme parent mâle, de nombreuses graines immatures sont produites. Les embryons immatures, sauvés et cultivés *in vitro*, génèrent des hybrides triploïdes donnant des fruits sans pépins.

3. Impact de la polyploïdie sur l'adaptation des agrumes aux contraintes environnementales

En général, la polyploïdie entraîne une différenciation phénotypique importante entre génotypes diploïdes (2x) et tétraploïdes (4x). Zhang et al. (2009) ont montré que les (4x) autotétraploïdes de radis présentaient une tolérance accrue vis-à-vis du stress hydrique, du froid et du stress nutritif. Les (4x) présentent des valeurs de fuite d'ions (Ion Leakage), des taux de malondialdéhyde (MDA), d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène bien inférieurs comparé à celles mesurées chez les (2x). De même, les activités des enzymes antioxydantes, telles que pour la superoxyde dismutase, la peroxydase, la catalase, l'ascorbate peroxydase et la glutathion réductase sont plus importantes chez les (4x). Enfin, des taux élevés d'antioxydants (acide ascorbique et glutathion) ont été également notés chez ces derniers. Une autre étude réalisée par Deng et al. (2012) a montré que des plantes (4x) de tabac possédaient également des systèmes de défense antioxydante plus performants que ceux des

(2x) ainsi qu'ils acquièrent une meilleure tolérance au stress abiotique, au froid et au stress nutritif (Figure 5).

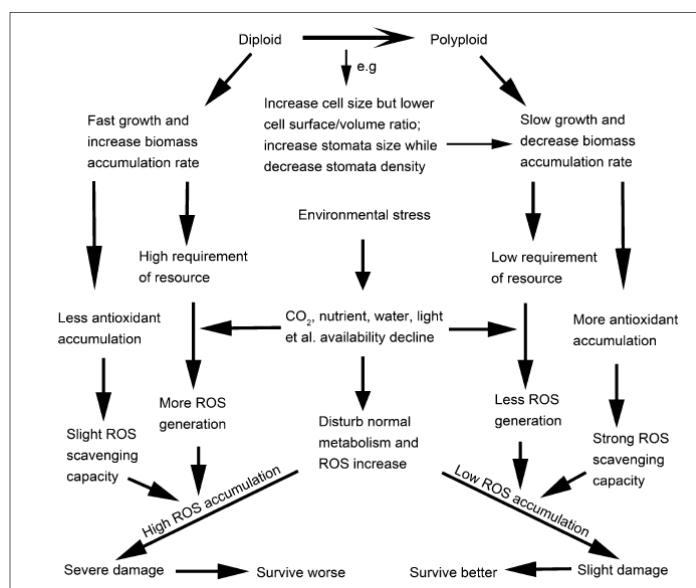


Figure 5 : Comparaison entre polyploïdes et diploïdes en condition de stress
(Deng et al., 2012)

Chez les agrumes, les (4x) sont plus tolérants au stress salin et au déficit hydrique que leurs (2x) respectifs (Saleh et al., 2008 ; Mouhaya et al., 2010 ; Allario et al., 2013). Cette tolérance accrue au déficit hydrique a également été observée lorsque les génotypes (4x) ont été utilisés comme porte-greffes en association avec une variété sensible (Allario et al., 2013). Chez les orangers (2x) greffés sur des limetiers Rangpur (4x), la transpiration foliaire est plus faible et la synthèse d'acide abscissique (ABA) est plus élevée que sur ceux greffés sur des limetiers Rangpur (2x). Il semble donc que la tolérance accrue des porte-greffes (4x) puisse être liée à une régulation plus efficace des flux de transpiration et que celle-ci est liée à des synthèses accrues d'acide abscissique (ABA) racinaire chez les porte-greffes (4x). L'étude, en situation de déficit hydrique, de l'expression des gènes des porte-greffes polyploïdes greffés, au moyen de microarrays et par RT-qPCR, montre que les porte-greffes (4x) surexpriment fortement des gènes impliqués dans la tolérance au stress au niveau de la racine (Allario et al., 2013).

VIII. Les principaux porte-greffes d'agrumes

1. Intérêt de l'utilisation et de l'amélioration des porte-greffes

L'utilisation des porte-greffes est devenue systématique en agrumiculture moderne. Le porte-greffe classiquement utilisé jusque dans les années 50, dans tous les pays agrumicoles, a été le bigaradier ou l'oranger amer (*Citrus aurantium*). Cependant, bien qu'il soit en tant que tel résistant à la Tristeza, il présente l'inconvénient, lorsqu'il est utilisé comme porte-greffe, de ne pas conférer de résistance à l'association greffon/porte-greffe vis-à-vis de cette maladie. Il est aussi sensible au *Phytophthora* (champignon dont les attaques se manifestent par un pourrissement de l'écorce au collet de l'arbre, l'exsudation de gomme puis un dépérissement de la frondaison) et l'Exocortis (maladie à virus entraînant des desquamations de l'écorce et une réaction d'incompatibilité au niveau du point de greffe).

De nouveaux porte-greffes sont donc recherchés. Ils doivent apporter des tolérances ou résistances à certains facteurs biologiques et pédoclimatiques : maladies (Tristeza, *Phytophthora*, Exocortis), ravageurs (nématodes...), sécheresse, froid... Ils doivent également apporter une amélioration conséquente pour les qualités agronomiques suivantes : rapidité de mise à fruit, allongement de l'époque de maturité, productivité (augmentation du rendement et du calibre des fruits), qualités organoleptiques des fruits et souplesse des techniques culturales du verger (taille, irrigation, fumure, durée des travaux...).

Depuis 35 ans, la Station de Recherches Agronomiques de San Giuliano étudie les meilleures associations clémentiniers / porte-greffes adaptées à la Corse et au bassin méditerranéen. En 30 ans, plus de 170 porte-greffes ont été testés quant à leur effet sur le rendement, le calibre et la qualité de la clémentine. Les meilleurs résultats en termes de rendement et de qualité interne des fruits (% de jus, taux d'acidité et teneur en sucre) sont obtenus avec les clones de *Poncirus trifoliata* avec certains de leurs hybrides inter génériques tels que les Citranges Troyer et Carrizo (hybrides *C. sinensis* (oranger) x *P. trifoliata*). Ces porte-greffes restent sensibles à l'Exocortis, mais ils confèrent une tolérance ou une résistance à la tristeza et une tolérance au froid. Ils apportent donc une nette amélioration par rapport au bigaradier (Tableau 2).

2. Les principaux porte-greffes des agrumes

- a. **Le bigaradier (*C. aurantium*)** : C'était le porte-greffe le plus utilisé jusqu'à 1993. Il est tolérant à l'Exocortis, la Psorose et la Xyloporose. Il résiste relativement bien à l'asphyxie racinaire, la salinité, la chlorose ferrique et la sécheresse ainsi qu'aux champignons *Phytophthora* spp. et *Armillaria mellea*. Il induit une bonne productivité

et qualité de fruits avec toutes les variétés d'oranger et de mandarinier. L'association avec le citronnier n'est pas bonne (sensibilité au niveau du point de greffe). Il est très bien adapté aux conditions édapho-climatiques, mais son principal défaut est sa sensibilité à la Tristeza, maladie virale de quarantaine, quand il est associé à une variété d'oranger ou de mandarinier.

- b. Le mandarinier Cléopâtre (*C. reshni*) :** c'est un porte-greffe tolérant à la Tristeza, l'Exocortis, la Psorose et la Xyloporose. Il est également résistant à la chlorose ferrique et très résistant à la salinité. Il est moyennement résistant au *Phytophthora* et sensible à l'asphyxie racinaire. Son principal défaut est l'irrégularité qu'il induit sur le développement des arbres auxquels il confère une vigueur moyenne à faible. De plus, l'entrée en production est légèrement retardée. Néanmoins, la production et la qualité des fruits des variétés greffées sont bonnes. Seul le citronnier présente un problème de compatibilité.
- c. Le *Poncirus trifoliata* :** il est très utilisé en Corse, au Brésil, au Japon, en Uruguay et en Argentine. Il est tolérant à la Tristeza, la Psorose et la Xyloporose. Il est résistant aux champignons *Phytophthora* spp. et *Armillaria mellea*, ainsi qu'aux nématodes. Il est très résistant au froid et à l'asphyxie racinaire et s'adapte bien à plusieurs sols même lourds et humides. Son principal inconvénient est sa sensibilité au calcaire actif et à la salinité. Il est aussi sensible à l'Exocortis. Même si ce porte-greffe est considéré comme peu vigoureux, il peut induire un développement normal des arbres sur des sols acides. Il induit une bonne productivité et une bonne qualité des fruits.
- d. Les Citranges :** ce sont des hybrides inter-génériques entre *C. sinensis* (oranger) et *P. trifoliata* obtenus par Swingle en Floride. Plusieurs Citranges ont été obtenus comme Rusk, Morton, Cunningham, Savage, Benton, Uvalde, Willits, Troyer et Carrizo. Ces deux derniers ont été obtenus en pollinisant des fleurs de 'l'oranger Washington navel' avec du pollen de *P. trifoliata*. Actuellement, le Citrange Troyer est utilisé en Californie et Carrizo en Floride et en Espagne. Les Citranges sont sensibles au champignon *A. mellea* et modérément résistants au *Phytophthora* spp., ils sont tolérants à la Tristeza, à la Psorose et à la Xyloporose mais sensibles à l'Exocortis. Ils sont sensibles au calcaire actif et à la salinité. Ils possèdent une bonne compatibilité avec les variétés d'orange douce, mandarinier et pomelo. Ils sont incompatibles avec la variété de citronnier Eureka. Les variétés greffées présentent d'excellentes récoltes avec une qualité commerciale élevée.

- e. **Volkameriana (*Citrus volkameriana* Pasquale)**: ce porte-greffe est un hybride naturel de citronnier. Il présente une bonne tolérance au calcaire et une résistance modérée au froid, à la salinité, aux attaques de *Phytophthora spp.* et au mal secco (Phoma tracheiphila). Il est tolérant à la Tristeza, l'Exocortis et probablement à la Xyloporose. Il est sensible à certaines viroses et aux nématodes. Il induit une bonne production, même si de qualité inférieure à celle conférée par d'autres porte-greffes. Il se comporte bien comme porte-greffe de citronnier.
- f. **Citrumelos (*Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata*)**: les Citrumelos sont des hybrides inter-génériques obtenus par Swingle en 1967 en pollinisant des fleurs de pomélo (*C. paradisi*) par du pollen de *P. trifoliata*. Parmi les nombreux Citrumelos on distingue le CPB 4475 (= Citrumelo Swingle) qui est résistant à la Tristeza, l'Exocortis, la Psorose et la Xyloporose. Il est résistant aux attaques de *Phytophthora spp.* et des nématodes. Il présente également une résistance élevée au chancre et une résistance modérée au froid et à la salinité. Son principal inconvénient est sa sensibilité marquée au calcaire. C'est un porte-greffe très vigoureux qui induit une bonne production de bonne qualité commerciale.
- g. **Le limetier Rangpur (*Citrus limonia* Osbeck)** : Le limetier Rangpur, bien que tolérant à la Tristeza, est sensible au pourrissement du collet, au *Phytophthora* et à l'Exocortis. Considéré comme tolérant aux chlorures et à la sécheresse, il est sensible aux excès d'eau. Le calibre des fruits produits par les greffons sur limetier Rangpur est moyen et leur qualité est bonne. Le limetier Rangpur confère, en plus, une excellente vigueur et une robustesse au froid. Enfin, il est encore beaucoup utilisé en Amérique du sud, particulièrement en Argentine et au Brésil.

Tableau 2 : Caractéristiques des principaux porte-greffes des agrumes
(Hardy, 2004)

Porte-greffe	Salinité	Calcaire	Type de sol			Phytophthora	Tristeza	Exocortis	Nématodes	Qualité du fruit					
			Sablonneux	Argileux	Peu drainé					Taille F.	Texture de la peau	Stade de maturité	Total solides solubles	Contenu en acide	Contenu en jus
P. trifoliata	+++++	+++++	++	++	+	+	+	+++++	+	Moy.	Lisse	tardive	Elevé	Elevé	Elevé
Swingle citrumelo	++	++++	++	++	++	++	+	++	+	Large				Moyen	
Citrange Troyer	+++	++++	++	++	++	++	+	++++	+++	Moy.		Moyen		Faible	Faible-Moyen
Citrange Carrizo	+++	++++	++	++	++	++	+	++++	+++						
Mandarinier Cléopâtre	+	+	+++	++	+++	+++	+	+	++++	Faible	Moyen		Moyen	Moyen	Moyen-Elevé

+ : Plus tolérant
+++++ : Plus sensible

IX. Création variétale chez les porte-greffes

Les premiers programmes d'amélioration variétale d'agrumes ont commencé en Italie à la fin du XIX^{ème} siècle, suite à de très graves infections de *Phytophthora* Sp. sur l'oranger (*Citrus sinensis* L. Osbeck), les citronniers (*C. limon* L. Burm. f.) et les mandariniers (*C. reticulata* Blanco), puis en Floride suite à un gel qui a causé d'immenses dégâts dans les vergers d'agrumes. Le problème du *Phytophthora* a été résolu en utilisant de l'oranger amer (*C. aurantium* L.) comme porte-greffe, alors que Swingle and Webber en Floride ont tenté d'introduire les propriétés de résistance au froid du *Poncirus* dans l'oranger : aucun de ces hybrides ne donna satisfaction comme variétés productrices mais bien des années plus tard, quelques uns de ces hybrides appelés Citrange, furent sélectionnés comme porte-greffes. Les Citranges "Troyer" et "Carrizo" sont aujourd'hui utilisés comme porte-greffes (Nicotra, 2001).

L'objectif des programmes d'amélioration variétale est de créer des porte-greffes d'agrumes résistants ou tolérants aux organismes nuisibles et aux maladies, d'accroître l'adaptabilité à différentes conditions de sols et d'environnement, de transmettre aux greffons une productivité élevée, et favoriser la qualité des fruits et d'accroître leur calibre (Hardy, 2004). La tolérance à la salinité et à la sécheresse sont aujourd'hui des objectifs essentiels de la sélection chez les porte-greffes. Le potentiel des méthodes conventionnelles d'amélioration des porte-greffes d'agrumes est limité par différents facteurs biologiques tels l'hétérozygotie, la stérilité du pollen et des ovules, l'incompatibilité gamétophytique, l'apomixie (polyembryonie nucellaire), et la juvénilité. Les laboratoires de recherches horticoles américains (USDA-ARS) ont réalisé des hybridations sexuelles entre génotypes diploïdes afin de produire des hybrides améliorés. Deux Citrandarins sont aujourd'hui proposés aux agriculteurs "US-852" [mandarinier *Changsha* (*C. reticulata*) x (*Poncirus trifoliata*)] et "US-812" (mandarinier *Sunki* x oranger trifolié *Benecke*), qui donnent des arbres plus tolérants aux maladies, une qualité de fruits excellente et une grande productivité (Nicotra, 2001).

Depuis les années 2000, l'IVIA en Espagne propose de nouveaux porte-greffes hybrides qui sont tous résistants ou tolérants au virus de la Tristeza et à la salinité. Le "F&A 5" (*C. reshni* x *P. trifoliata*) est résistant aux nématodes des agrumes et offre une bonne tolérance aux sols calcaires et aux inondations. Le "F&A 13" (mandarinier Cléopâtre x *P. trifoliata*) est sensible aux nématodes des agrumes mais il est très tolérant à la salinité et aux inondations. Le "F&A 418" (citrange Troyer x mandarinier Commun) est un porte-greffe nanisant avec une bonne tolérance aux sols calcaires, sensible aux nématodes des agrumes et produit de gros fruits de la variété greffée. Le "F&A 517" (*C. nobilis* x *P. trifoliata*) est également un porte-

greffe nanisant. Il présente une bonne tolérance aux sols calcaires et à la salinité (Nicotra, 2001).

Compte-tenu des difficultés de l'amélioration conventionnelle, liées à la biologie des agrumes, d'autres stratégies ont été mises en œuvre. L'hybridation somatique par des techniques de fusion de protoplastes est une nouvelle manière de créer de nouveaux porte-greffes d'agrumes pouvant contourner les aléas de reproduction chez les agrumes. La plupart des institutions scientifiques impliquées dans la reproduction pour l'amélioration des porte-greffes utilise cette technologie. (Grosser et al., 1994 ; Nicotra, 2001; Alesa et al., 2011 ; Dambier et al., 2011). Différents hybrides somatiques (HS) ont ainsi été produits par fusion de protoplastes. Des HS associant le *Poncirus* 'Flying Dragon' se sont révélés être extrêmement nanisants et précoces, alors que des hybrides de *Fortunella*, *Citropsis*, *Atalantia*, *Microcitrus* ou apparenté au *Citrus ichangensis* sont résistants aux nématodes *Radopholus citrophilus*. De plus, les graines de ces HS présentent une bonne germination et donnent de jeunes plants vigoureux. Le CIRAD en France a sélectionné un hybride somatique inter générique vigoureux et résistant à la tristeza issu d'une fusion entre *Poncirus trifoliata* et *Citrus deliciosa*. Il est également tolérant aux sols calcaires (Ollitrault et al., 2000).

Le transfert de gènes pourrait prochainement donner naissance à des variétés cultivées résistantes aux maladies et aux insectes, dans la mesure où des recherches sont menées pour identifier les gènes de résistance à la Tristeza, aux nématodes, à l'*Alternaria*.... En revanche, cette stratégie ne semble pas être bien adaptée aux caractères quantitatifs tels que la productivité et la qualité des fruits (Nicotra, 2001).

X. Stress hydrique et stress salin chez les plantes

Lors d'un déficit hydrique, la diminution de la quantité d'eau disponible dans le sol entraîne un déficit en eau au niveau de la plante qui peut provoquer la mort de celle-ci. Au niveau cellulaire, le stress peut entraîner une augmentation de la concentration des solutés, un changement de la forme des cellules, une perte de la turgescence, la perturbation de l'intégrité des membranes et enfin la dénaturation des protéines (Gill et Tuteja, 2010). Les mécanismes d'adaptation au déficit hydrique vont dépendre de la sévérité du stress, de la sensibilité de la plante, ou encore de son stade de développement. La perception du stress osmotique va se traduire par l'induction de nombreux gènes. Ces différentes étapes qui peuvent être propres à chaque type de stress rendent compte de la complexité des phénomènes mis en œuvre. Très brièvement, un stress hydrique peut se résumer de la manière suivante : la première étape de la perception du stress hydrique se traduit au niveau cellulaire par une perte de turgescence, un

changement du volume cellulaire et une altération des connexions paroi-plasmalemmes. La machinerie d'adaptation au contrainte hydrique est mise en marche à ce moment-là et correspond à la synthèse des molécules protectrices telles que les solutés compatibles (les osmolytes), les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) ainsi qu'à la mise en place du système des défenses antioxydantes. Ces protéines peuvent jouer le rôle d'osmosenseur, cela a été déjà mis en évidence chez les levures et semble de même exister chez les plantes supérieures. La seconde étape conduit à l'induction de gènes spécifiques qui vont entraîner la synthèse d'ABA (Acide abscissique) au niveau racinaire. Elle permettra la fermeture des stomates mais aussi la synthèse de *phospholipase C*, *Map Kinases* impliquées dans la transduction du signal pour l'activation de la synthèse des molécules protectrices des cellules (Figure 6).

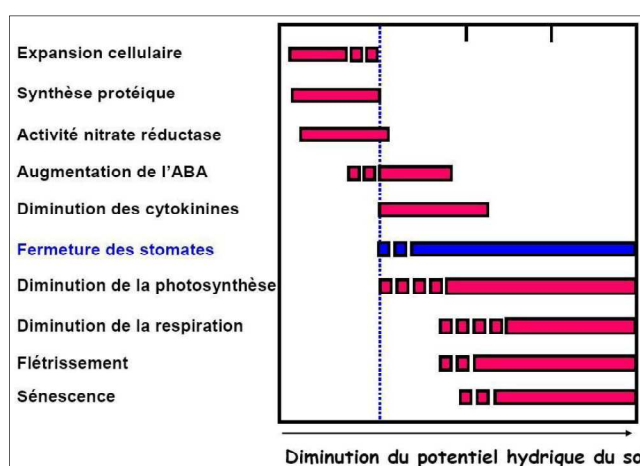


Figure 6: Schéma récapitulatif de la réponse à un déficit hydrique (Laloi, 2010)

Des voies de signalisation sont activées en réponse aux stress environnementaux. La réponse au stress (salin ou hydrique) est initiée quand une plante perçoit un déficit hydrique au niveau cellulaire. La reconnaissance du signal va conduire à l'activation de voies de transduction du signal qui seront à l'origine de modification de l'expression des gènes du métabolisme et de l'ajustement de la quantité d'eau au niveau cellulaire. Les récepteurs du signal sont des molécules qui vont émettre une cascade de signaux pour permettre la transmission du signal au niveau intracellulaire et ainsi activer les facteurs de transcription qui induiront à leur tour l'activation/la régulation de gènes spécifiquement impliqués dans la réponse au stress (Panjabi-Sabharwal et al., 2010). Il a été démontré que la sécheresse, le sel et le froid induisent un afflux transitoires de Ca^{2+} au niveau du cytoplasme cellulaire. Cette étape

constitue le premier pas dans l'adaptation aux contraintes. Les principales voies de signalisation, lors d'un stress abiotique, ont pu être mises en évidence, celles-ci incluent :

- La voie de signalisation de l'ABA.
- Les changements de l'expression des gènes suite à la signalisation de la voie des «MITROGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE » MAPK afin de réguler du statut redox de la cellule.
- La modification de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse « LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT PROTEINS » LEA, afin de permettre la régulation de l'homéostasie osmotique dans la cellule (Gimeno et al., 2009).
- Les modifications engendrées grâce à la voie « SALT OVERLY SENSITIVE » SOS. En effet, la voie SOS est composée de trois protéines (SOS1, SOS2 et SOS3) impliquées dans la réponse au stress salin. La cascade commence par la fixation du Ca^{2+} sur la protéine SOS3, une protéine senseur fixatrice de Ca^{2+} (Liu et Zhu, 1998). Les modifications provoquées par la liaison du Ca^{2+} vont favoriser la fixation de la protéine SOS2. Cette sérine/thréonine kinase contient un site catalytique kinase à l'extrémité N terminale et une région régulatrice C-terminale contenant un domaine d'auto-inhibition. Les domaines régulateur et catalytique interagissent entre eux, en condition normale, bloquant ainsi le site catalytique. La fixation de SOS3 active SOS2 en levant son auto-inhibition permettant ainsi de libérer son site catalytique (Guo *et al.*, 2001). La première cible identifiée du complexe SOS2-SOS3 est la protéine SOS1, un antiport Na^+/H^+ situé sur la membrane plasmique et responsable de l'exclusion du Na^+ à l'extérieur du cytosol (Shi et al., 2000 et 2002). La kinase du complexe SOS2-SOS3 active l'antiport SOS1 par phosphorylation (Quintero *et al.*, 2002). En outre, le complexe SOS2-SOS3 serait impliqué dans la régulation d'autres effecteurs de la tolérance au stress salin. Il inhiberait le transporteur à faible affinité de Na^+ (HKT1) (Uozumi *et al.*, 2000) et activerait l'antiport vacuolaire Na^+/H^+ (NHX1) (Qiu *et al.*, 2004) afin que les ions Na^+ soient à la fois empêchés de rentrer dans le cytosol et séquestrés dans les vacuoles. La surexpression des gènes *SOS1* (Shi et al., 2002) et *SOS2* (Guo et al., 2004) a permis d'améliorer la tolérance au stress salin de plant d'*Arabidopsis*.

D'autres voies de signalisation indépendantes du stress seront aussi activées et correspondent à l'absorption d'ions potassium ou sodium. Ces ions interviennent, avec les radicaux libres oxygénés, comme des seconds messagers pour l'activation des systèmes antioxydants. Si les voies de signalisation restent encore mal comprises, il a pu être mis en évidence l'intervention d'un ensemble de protéines kinases et de facteurs de transcription qui vont être à l'origine de la

« mise en marche » de la machinerie de défense chez la plante lors d'un stress (Gimeno et al., 2009).

1. Déficit hydrique

Le déficit hydrique, considéré comme l'une des plus importantes contraintes environnementales, est à l'origine de l'arrêt de la croissance, de la réduction de la taille des fruits des agrumes (Rodriguez-Gamir et al., 2010) et de la diminution du rendement (Masmoudi et al., 2010 ; Deng et al., 2012).

La survie de la plante dans des conditions de stress dépend de sa capacité à percevoir le stress, générer et transmettre le signal aux différentes parties de la plante et à initier un ensemble de modifications physiologiques et chimiques (Ahmadizadeh et al., 2011). Les conséquences du déficit hydrique sont la réduction des échanges gazeux, de l'assimilation du CO₂ (la réduction de la conductance stomatique suite à la fermeture des stomates) (Rodriguez-Gamir et al., 2010 ; Ahmedizadeh et al., 2011) ainsi que l'abaissement du potentiel hydrique cellulaire (Gimeno et al., 2009 ; Deng et al., 2012) et de la quantité d'eau contenue dans les cellules (Masmoudi et al., 2010). Des modifications morphologiques telles que l'abscission des feuilles (Masmoudi et al., 2010) et des fruits ont pu être observées suite à des manifestations de stress (Gimeno et al., 2009) ainsi qu'une augmentation de la fuite d'ions au niveau cellulaire. Dans ces conditions là, la fuite d'ions peut augmenter de 11 à 54% chez un génotype de maïs (*Zea mays*) sensible au stress. Néanmoins, l'augmentation est plus faible pour les cultivars présentant des signes de tolérance au stress (Masmoudi et al., 2010). Chen et al. (1991) ont, d'autre part, proposé que l'augmentation du taux de la fuite d'ions pourrait être due à une dégradation de la chlorophylle suite à la sénescence des feuilles. Pour McDonald et Archbold (1998), cette augmentation serait une conséquence de la réduction de la teneur en eau dans les feuilles.

Romero et al. (2006) ont montré que chez les agrumes les besoins en eau sont fonction de la taille de l'arbre et de la surface foliaire. De même Moya et al. (2003) ont mis en évidence l'existence d'une corrélation positive entre la surface foliaire et la transpiration de l'arbre. La perte des feuilles, lors du stress hydrique, entraîne donc une réduction de la surface foliaire, et donc, moins de perte en eau. Cela permet à la plante de maintenir un taux de transpiration constant. De plus, il a pu être montré que le stress hydrique est à l'origine d'une réduction de la teneur en chlorophylle dans les feuilles. En condition d'un stress sévère, le taux de chlorophylle est réduit de plus de 55% par rapport aux plants témoins. Toutefois, il est

à noter que la sensibilité au stress hydrique dépend des caractéristiques physiologiques, morphologiques et anatomiques des espèces et des cultivars (Ben Ahmed et al., 2010)

a. Fermeture stomatique : implication de l'acide abscissique (ABA)

i. Rôle de l'ABA dans la signalisation du stress de la racine vers la feuille

Le maintien de l'état de turgescence au niveau cellulaire lors d'un stress hydrique est indispensable pour la survie de la plante. Ce processus est associé aux divers processus de régulation stomatique, dans un premier temps, puis en second temps à l'accumulation de solutés compatibles (Ben Ahmed et al., 2010). Un déficit hydrique est détecté par les racines en contact direct avec les zones desséchées du sol (Pirzad et al., 2011). La synthèse d'acide abscissique (ABA) est alors induite dans les racines. L'ABA est une phytohormone dont le rôle essentiel est le maintien du fonctionnement de la plante en situation de stress (Jiang et Yu, 2009) (Figure 7).

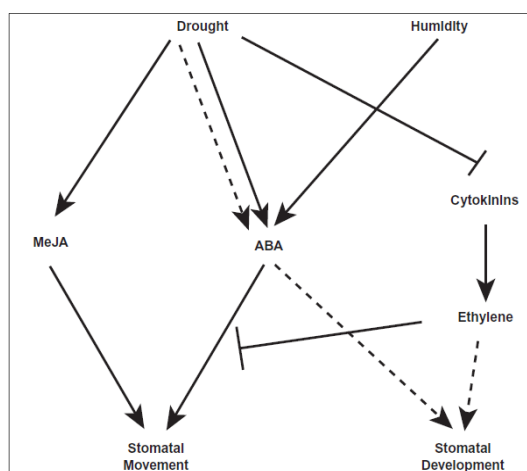


Figure 7: Réponses stomatiques induites par la sécheresse : les lignes continues indiquent la régulation de l'ouverture et de la fermeture des stomates, les lignes discontinues renseignent sur la régulation de développement des stomates (Li et Assmann, 2010)

L'ABA produit est ensuite véhiculé jusqu'aux parties aériennes *via* les vaisseaux du xylème (Rodriguez-Gamir et al., 2010). Ce processus prend place avant que l'abaissement du potentiel hydrique du sol n'entraîne de changement notable du potentiel hydrique foliaire. Ceci suggère que l'ABA, qui contrôle la fermeture stomatique des feuilles, est le signal racinaire permettant de réduire le flux transpiratoire lors d'un déficit hydrique (Li et Assmann, 2010) (figure 8).

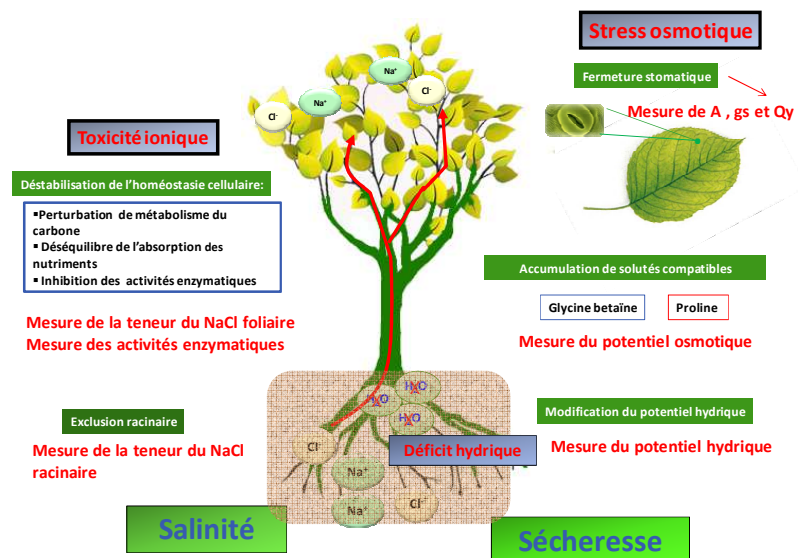


Figure 8: Effet du stress hydrique et de la salinité sur les plantes (Ben Yahmed, 2013)

Tout l'ABA transporté par le xylème ne gagne pas inéluctablement les cellules de garde. En effet, la majorité de l'ABA du flux transpiratoire sera absorbée et métabolisée dans les cellules du mésophylle. Cependant, durant les étapes précoces du stress, la sève xylémique s'alcalinise (Guo et al., 2004). Son pH s'accroît d'environ 6,3 à 7,2 (Wilkinson et Davies, 1997). Or, la forme dissociée de l'ABA, soit sa forme anionique (ABA^-), s'accumule dans les compartiments alcalins des cellules de la plante. L' ABA^- contenu dans ces compartiments peut être mobilisé suivant les changements de pH prenant place à travers la membrane. En plus de la compartimentation suivant le pH relatif, des transporteurs spécifiques participent au maintien du faible taux d'ABA apoplastique chez les plantes non stressées. Les résultats établis par Gueta-Dahan et al. (1997) suggèrent que l'apport exogène de l'ABA n'affecte pas l'activité enzymatique des Mn-Cu-Zn-SOD isozymes, et aussi que l'ABA n'agit pas sur l'activité de l'APX ou le cAPX au niveau des cellules des agrumes. Plusieurs études ont montré que le sel engendre une accumulation de l'ABA au niveau foliaire mais les effets du sel restent tout de même loin d'être contrôlés par l'ABA.

ii. Voie de biosynthèse de l'ABA

La biosynthèse de l'ABA s'accomplit au niveau des chloroplastes via la voie de biosynthèse des terpénoïdes. La voie de biosynthèse de l'ABA partage un précurseur commun aux voies de biosynthèse des hormones végétales gibbérellines, cytokinines et l'isopentenyl diphosphate (IPP), qui conduit à la synthèse de violaxanthine. La formation de violaxanthine est catalysée par la zéaxanthine époxidase (ZEP) codé par le gène *ABA1* chez *Arabidopsis*, ce

iii. *L'ABA : l'hormone de stress*

L'ABA est une molécule présentant un carbone 15 (C15) et dérivant de la CEI-xanthophylle (C40) précurseur des caroténoïdes zéaxanthine. Le gène d'*Arabidopsis* *ABA1* code la zéaxanthine époxydase, qui catalyse la conversion de la zéaxanthine à violaxanthine (Xiong et al., 2002; Nambara et Marion-Poll, 2005 ; Li et Assmann, 2010). De plus, ce gène est induit essentiellement par la sécheresse. La violaxanthine est converti en néoxanthine puis en 9'-cis-néoxanthine et 9'-cis-violaxanthine, qui sont à la fois des CEI-xanthophylles (C40). Le gène *ABA4* a été identifié suite à des clonages et il a été défini comme un régulateur positif de la synthèse de la néoxanthine (North et al, 2007 ; Li et Assmann, 2010) et il assure essentiellement l'adaptation aux conditions de sécheresse. La voie spécifique de synthèse de l'ABA commence par le clivage de la CEI-xanthophylles en C15 xanthoxin et en un C25 par 9'-cis-dioxygénases Epoxycarotenoid (*NCED*) (Nambara et Marion-Poll, 2005 ; Li et Assmann, 2010).

Chez *Arabidopsis*, on a pu identifier que la synthèse de l'ABA implique une famille de neuf gènes *NCED* (Iuchi et al., 2001 ; Li et Assmann, 2010). Le gène *AtNCED2* a été mis en évidence dans les cellules de garde des feuilles sénescents, le gène *AtNCED3* s'exprime dans les cellules de garde des cotylédons, l'hypocotyle et les pétioles. Les mêmes gènes, *AtNCED2* et *AtNCED3* ont été mis en évidence dans les racines, ce qui prouve que ces deux gènes jouent un rôle important dans les processus de biosynthèse l'ABA racinaire.

Les *AAO3* (*Arabidopsis* Aldehyde Oxidase 3) sont des enzymes liées à *AtNCED*. Ces dernières catalysent la transformation de la xanthoxine en l'aldéhyde abscissique et de l'aldéhyde abscissique en acide abscissique (Cheng et al., 2002; Koiwai et al., 2004 ; Li et Assmann, 2010). L'activité de l'*AAO3* est commandée par le gène, *ABA3*, codant pour une MoCo sulfureuse. Parmi tous les gènes de biosynthèse de l'ABA chez *Arabidopsis*, seul *NCED3* est fortement induit par la sécheresse au niveau du tissu vasculaire de la feuille (Iuchi et al, 2001 ; Endo et al, 2008 ; Li et Assmann, 2010). L'expression du gène *AAO3* a été mise en évidence dans les cellules de garde et ce gène est significativement induit par la sécheresse (Koiwai et al., 2004; Li et Assmann, 2010).

iv. *L'ABA et la fermeture stomatique*

La fermeture des stomates intervient lors d'un déficit hydrique subi par la plante. Elle a pour but de limiter la transpiration et, ainsi, de réduire les pertes en eau. La variation de turgescence au niveau des cellules de garde autorise l'ouverture ou la fermeture des stomates. Les cellules de garde étant situées sur l'épiderme, la baisse de turgescence peut être la

résultante d'une perte directe d'eau sous forme de vapeur dans l'atmosphère (Gao et al., 2005). Constamment synthétisée à un faible taux dans les cellules du mésophylle, l'ABA tend à s'accumuler dans les chloroplastes. Lorsque les premiers effets d'un déficit hydrique sont ressentis par les cellules du mésophylle, l'ABA accumulé jusqu'alors dans les chloroplastes va être libéré dans l'apoplasme (Hartung et al., 1998). Plus en détail, la perte de turgescence conduisant à la fermeture stomatique est induite par un afflux à long terme de potassium (K^+) et d'anion. L'ouverture des canaux sortant de K^+ nécessite une dépolarisation membranaire à long terme, déclenchée à la fois par une dépolarisation transitoire de la membrane plasmique induite par l'ABA et par une « bouffée » de calcium cytosolique. Il a été démontré que l'ABA stimulait l'activation des canaux lents anioniques dans la cellule de garde (Tallman, 2004). De même, l'ABA activerait des canaux anioniques rapides (Raschke et al., 2003). L'ouverture prolongée de ces canaux anioniques autorise la sortie, hors de la cellule, d'une grande quantité de chlorures (Cl^-) et de malate, ce qui a pour effet de dépolariser fortement la membrane et d'entraîner l'ouverture des canaux voltage dépendant à efflux de K^+ . Cette dépolarisation est appuyée par l'inhibition des pompes $H^+ATPase$ membranaire engendrées par les bouffées calciques (Kinoshita et al., 1995) sous contrôle de l'ABA. Ces processus dirigés par l'ABA ont pour conséquence une alcalinisation du cytosol et une augmentation de Ca^{2+} cytosolique (Zhou et al., 2000). Les pompes $H^+ATPase$ neutralisées, les canaux à afflux de K^+ ne peuvent plus s'ouvrir : ce procédé prévient toute ouverture des stomates.

En résumé, les concentrations intracellulaires en ions calcium et en protons affectent les canaux de la membrane en inhibant à la fois l'afflux de K^+ et l'activité des pompes $H^+ATPase$, ce qui prévient toute ouverture stomatique. En parallèle, l'activation des canaux anioniques à afflux, conduisant à l'ouverture des canaux à afflux de K^+ provoque la fermeture stomatique.

v. *Signalisation du stress hydrique au niveau des cellules de gardes*

Le stress hydrique est perçu par les cellules de garde comme un signal émis à partir de plusieurs hormones végétales, principalement de l'ABA, qui active un large éventail de messagers intracellulaires tels que calcium, l'oxyde nitrique (NO), les espèces réactives de l'oxygène (EOA) et l'acide phosphatidique (PA), et intracellulaires tels que des changements de pH. Un certain nombre de régulateurs génétiques a été identifié chez *Arabidopsis* et agissant en collaboration avec les messagers intracellulaires. En outre, ces messagers intracellulaires peuvent moduler la perméabilité membranaire à travers la régulation directe ou indirecte de la membrane plasmique et la membrane vacuolaire, les canaux ioniques, les transporteurs et les

pompes. Certains de ces messagers intracellulaires, tels que le calcium et les protons, régissent par les canaux membranaires et les pompes.

Les canaux membranaires, en collaboration avec un ensemble de transporteurs, assurent l'absorption et la libération des solutés osmotiquement actifs tels que K^+ , Cl^- et malate (2^-) du cytosol des cellules de garde et des vacuoles, ce qui résulte en des changements de la teneur en eau cellulaire et du volume des cellules de garde, aboutissant finalement à des changements dans l'état d'ouverture des stomates (Li et Assmann, 2010).

Des régulateurs génétiques impliqués dans la régulation de l'ouverture des stomates ont été découverts ces dernières années. On a démontré qu'une sérine protéase, SDD1, un peptide sécrétoire (Berger et Altmann, 2000 ; Li et Assmann, 2010), et des facteur de structuration épidermique (EPF1) (Hara et al., 2007 ; Li et Assmann, 2010)) sont impliqués dans la signalisation extracellulaire de la fermeture stomatique. Des récepteurs transmembranaire comme la protéine TMM (Geisler et al, 2000 ; Li et Assmann, 2010), et le récepteur transmembranaire, comme les kinases ER, ERL1 et ERL2 (Shpak et al., 2005 ; Li et Assmann, 2010) sont des éléments intermédiaires entre les signaux extracellulaires et les voies de signalisation intracellulaire de développement des stomates. Une cascade MAPK incluant YODA, MKK4/MKK5 et MPK3/MPK6 agit en aval des récepteurs membranaires des kinases pour réguler la fermeture stomatique (Bergmann et al., 2004; Wang et al., 2007 ; Li et Assmann, 2010 ; Rock et al., 2010)(Figure 10).

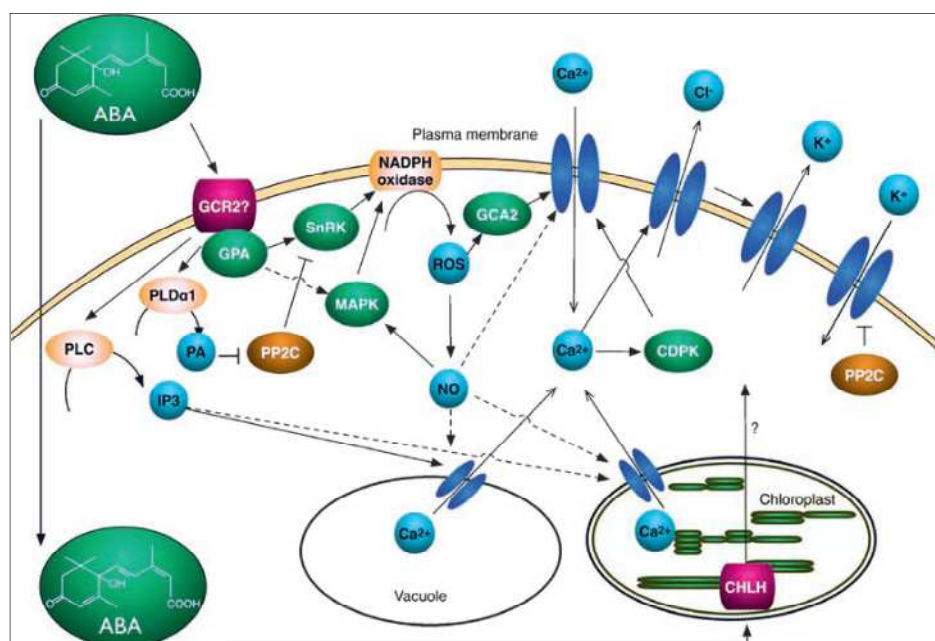


Figure 10: Illustration schématique de la signalisation de l'ABA pour la fermeture des stomates (Rock et al., 2010).

Gudesblat et al. (2007) ont pu mettre en évidence l'existence d'une corrélation positive entre le MPK3 et le taux d'ABA au niveau des stomates d'un côté et le MPK3 et la réponse aux EOA d'un autre côté. Les deux ICE1 et MPK3 sont également impliqués dans la réaction des plantes à des signaux environnementaux. Ces deux gènes sont des candidats potentiels pour une analyse approfondie de la façon dont les facteurs environnementaux modulent l'ouverture et la fermeture stomatique (Casson et Gray, 2008 ; Li et Assmann, 2010).

La synthèse de l'ABA induit des augmentations des taux de phospholipides, des EOA, du calcium et de l'oxyde nitrique (NO) (Miller et al., 2008; Neill et al., 2008 ; Rock et al., 2010). Ces molécules agissent comme des «seconds messagers» dans les réseaux de signalisation pour la fermeture des stomates. Une augmentation de l'inositol 1, 4,5-triphosphate (IP3), qui est catalysée par la phospholipase C (PLC), induit une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} . Cette étape est considérée comme clé dans la fermeture des stomates (Takahashi et al., 2001). L'IP3 est connu pour activer le transport du calcium des canaux vacuolaire (Allen et al., 1995). Un autre phospholipide, l'acide phosphatidique (PA), produit par l'action de la phospholipase D (PLD), joue également un rôle important dans signalisation de l'ABA.

b. Maintien de la balance hydrique par ajustement osmotique

i. Ajustement osmotique des cellules

Un sol soumis à une longue période de sécheresse voit son potentiel hydrique devenir de plus en plus négatif. Or, pour que la plante puisse absorber l'eau du sol, il est nécessaire que son potentiel hydrique soit plus négatif que celui du sol. Dans ces conditions, elle va pouvoir abaisser son potentiel hydrique par réajustement osmotique, c'est-à-dire, par une accumulation de solutés au niveau cellulaire. Ce procédé permet de réduire le potentiel hydrique cellulaire tout en maintenant la turgescence cellulaire (Figure11).

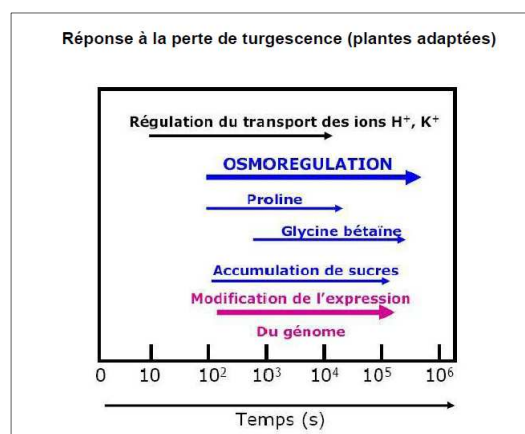


Figure 11: Temps de réponse pour l'induction des mécanismes de réponse au déficit hydrique (Laloi, 2010)

Ces solutés peuvent être aussi bien d'origine organique tels les sucres, les acides organiques et les acides aminés, que d'origine inorganique comme les ions, en particulier les ions potassium. La plupart de ces composés organiques accumulés dans le cytoplasme sont appelés des solutés compatibles, car ils n'interagissent pas avec les enzymes. Parmi ces solutés compatibles, on trouve la proline, la glycine bêtaïne et les sucres alcools tel que le sorbitol ou le mannitol (Shabala et Cuin, 2006).

ii. *Modification de l'expression génique induite par stress osmotique*

De nombreux gènes codant pour des enzymes impliquées dans l'ajustement osmotique sont surexprimés lors d'un stress osmotique. Par exemple, parmi les gènes évoqués, on trouve la Pyrroline-5-carboxylate synthase, une enzyme clef dans la voie de biosynthèse de la proline, la Bêtaïne aldéhyde déshydrogenase, associée à l'accumulation de la glycine bêtaïne et la *myo*-Inositol 6-*O*-methyltransferase qui contrôle l'accumulation du pinitol, un sucre alcool cyclique (Buchanan et al., 2000). Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des lignines sont aussi sous contrôle du stress osmotique (Narita et al., 2004). L'accroissement de la production en solutés peut aussi bien être le résultat d'une inhibition enzymatique suivant l'exemple du mannitol : en réponse à un stress osmotique, les gènes associés à la dégradation du mannitol dans la production de sucrose sont inhibés (Therios, 2008).

L'expression des gènes codant pour des protéines associées au transport membranaire, aux ATPases (Niu et al., 1995) et aux aquaporines (Maggio et Joly, 1995) est aussi modulée par le stress osmotique. De nombreuses autres protéines sont induites lors d'un stress osmotique, notamment des protéases dégradant et recyclant des protéines dénaturées, et des

protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité structurale de la paroi cellulaire tels que la S-adenosylmethionine synthase et les peroxidases (Pharr et al., 1999). Un groupe de gènes, lui aussi contrôlé par le stress osmotique, induit la synthèse de protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) qui sont suspectées de jouer un rôle dans la stabilisation des membranes plasmiques. Bien que leurs fonctions soient très peu connues, les protéines LEA possèdent une très grande affinité avec les molécules d'eau et sont accumulées dans les tissus végétatifs lors des épisodes de stress osmotique (Kobayashi et al., 2008 ; Nakayama et al., 2008). L'hypothèse la plus probable serait que leur capacité à fixer l'eau leur permettrait d'éviter la cristallisation de nombreuses protéines cellulaires et de renforcer ainsi la cohésion membranaire (Goyal et al., 2005). Un stress osmotique entraînera l'accumulation de l'ABA, et par répercussion, l'accumulation de protéines ABA-dépendantes. Plusieurs études sur des mutants ABA déficients et ABA insensibles ont montré que l'activation de nombreux gènes imputés au stress osmotique n'était en fait que la conséquence de l'accumulation de l'ABA lors du stress (Yoshida et al., 2006).

Les défenses antioxydantes sont importants pour la tolérance aux contraintes diverses dans la mesure où elles permettent à la plante de se protéger contre la production d'espèces réactives de l'oxygène (EOA). Il a été démontré qu'en condition de stress hydrique ou surtout salin, la surexpression des gènes contrôlant la synthèse de l'APX et GPX améliore la tolérance au stress (Ginemo et al., 2009). Chez les mandariniers, plus de 12 gènes sont fortement induits en condition de sécheresse au niveau des racines et des feuilles. Ces gènes sont homologues à ceux observés chez *Arabidopsis*. La forte régulation de ces gènes dans les racines et les feuilles suggère qu'ils peuvent être cruciaux pour la réponse des mandariniers à la sécheresse. Ces gènes contrôlent la synthèse des osmosenseurs (protéine LEA) et des osmolytes (l'induction du *P5CS*). La surexpression du *P5SC* à l'origine de l'accumulation de la proline, la surexpression des protéines LEA et l'accumulation du raffinose (jouant un rôle protecteur dans la protection contre les EOA) dans les organes stressés améliorent la tolérance au stress hydrique (Ginemo et al., 2009).

D'un autre côté, parmi les gènes qui sont sous exprimés, on peut citer les aquaporines ou plus exactement la famille MIP. Une répression de ces gènes a été observée au niveau des feuilles et des racines d'*Arabidopsis*. Néanmoins, ces gènes sont différents de ceux identifiés chez les agrumes. Cette répression en condition de stress hydrique peut être expliquée par une réduction de la perte de l'eau afin de maintenir la turgescence (Alexandersson et al., 2005).

iii. *Facteurs de transcription de la réponse stomatique à la sécheresse*

ABF2 (Kim et al., 2004 ; Li et Assmann, 2010), *ABF3* et *ABF4* (Kang et al., 2002 ; Li et Assmann, 2010) sont trois gènes qui présentent une surexpression dans les cellules de garde, en conditions de stress, suggérant des fonctions dans la régulation de l'expression génique des stomates. Chez les plantes transgéniques, la surexpression de chacun de ces trois gènes est à l'origine de la réduction de la perte d'eau et l'augmentation de la tolérance à la sécheresse, qui est probablement dû à la fermeture des stomates et les changements dans l'expression des gènes tels que *ABI1*, *ABI2*, *KAT1* et *KAT2* (Kang et al, 2002; Kim et al, 2004 ; Li et Assmann, 2010).

iv. *Transduction du signal*

La PLC-DGK (diacylglycérol kinases) et PLD (phospholipase D) interviennent dans la réponse des plantes au stress (Testerink et Munnik, 2005; Hong et al., 2008). Parmi les PLD, PLD $\alpha 1$ semble jouer un rôle dans la signalisation de l'ABA vu sa forte induction par l'hormone de stress. L'inhibition des PLD $\alpha 1$ entrainerait une inhibition de la fermeture stomatique en conditions de stress (Zhang et al. 2004).

L'ABA est connu pour déclencher la production de H₂O₂ qui active les processus de signalisation des EOA. L'ABA induit la production d'H₂O₂, et nécessite la NAD(P)H, suggérant l'implication de NAD(P)H oxydases (Murata et al., 2001; Neil et al., 2008 ; Rock et al., 2010). Deux gènes liés à la NAD(P)H oxydases (*AtrbohD* et *AtrbohF*) sont fortement exprimés dans les cellules de garde suite à la synthèse de l'hormone de stress et leur expression est régulée positivement par l'ABA. Cette signalisation des EOA active les canaux Ca²⁺ de la membrane plasmique des cellules de garde, qui favorisent la fermeture des stomates. L'ABA à l'origine de la production des EOA, peut également activer des gènes de défense du système antioxydant dans les feuilles de maïs (Guan et al., 2000).

De nombreux gènes induits par le stress osmotique provoqué par la sécheresse et la salinité sont aussi ABA-réactif (Seki et al., 2002). La majorité de ces gènes sont classés en deux groupes: des gènes liés à la protection des cellules du stress, comme les protéines Late Embryogenesis Abundant LEA (Ces composés sont des protéines dont les gènes sont induits lors d'un stress hydrique au niveau des racines et des feuilles). Ces protéines sont hautement hydrophiles et sont riches en glycine. La surexpression des LEA permettra donc une meilleure tolérance aux conditions de stress. Ces dernières vont être synthétisées pour permettre la protection de la machinerie cellulaire, le maintien de la structure des membranes ou des protéines et la compartimentation des ions (Gimeno et al., 2009). D'autres substances seront aussi synthétisées notamment les enzymes de biosynthèse, les osmolytes (tel que la proline), la

raffinose (considéré comme le principal osmolyte dans la mobilisation des EOA et dont l'accumulation dans les racines permettra une meilleure tolérance au stress (Gimeno et al., 2009)), le pinitol, les sucres (correspondant à des solutés compatibles) et d'autres composés qui vont permettre d'abaisser le potentiel osmotique cellulaire (Figure 12).

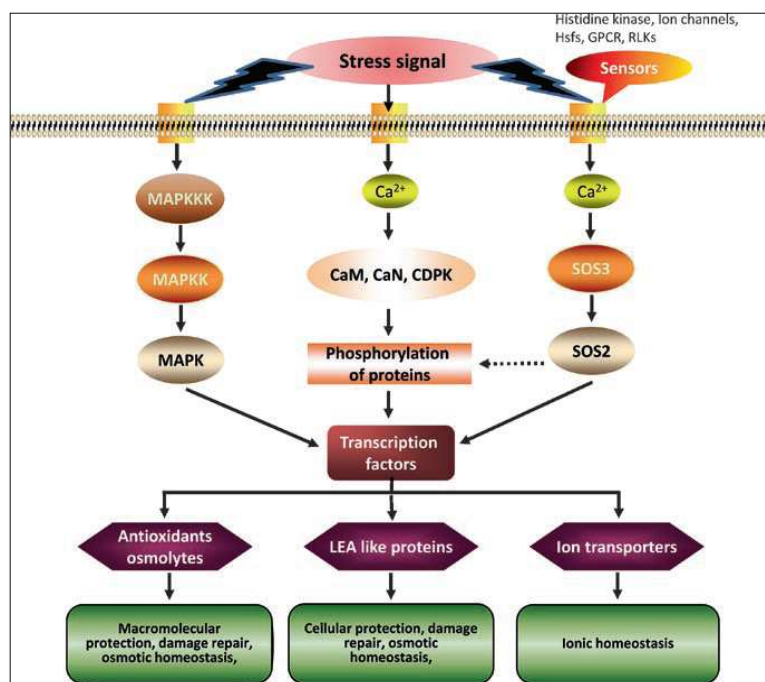


Figure 12 : Voies de signalisations impliquées dans la réponse au stress abiotiques
(Panjabi-Sabharwal et al., 2010)

2. Stress salin

a. Effets d'un stress salin au niveau de la plante

La salinité du sol est un facteur environnemental important qui affecte la croissance des plantes et la productivité agricole. Le problème de la salinité a été étudié sur le plan agronomique (Zekri, 1993 ; Ruiz et al., 1997), biochimique (Cerezo et al., 1997) et moléculaire (Gueta-Dahan et al., 1997). Le sel entraîne une réduction de la quantité de l'eau disponible dans le sol (piégeage des molécules d'eau par les ions).

Les niveaux de tolérance à la salinité sont très variables entre plantes (Rabie et Almadini, 2005). En effet, la salinité entraîne une réduction de la capacité des plantes à absorber l'eau, une chute des potentiels hydrique foliaire et osmotique (déshydratation cellulaire (Hamdia et Shaddad, 2010 ; Joseph et Jini, 2011)). Elle provoque aussi un déséquilibre de la balance ionique (accumulation des ions Cl^-) qui induira une toxicité importante dans le cytoplasme

(Joseph et Jini, 2011), la réduction de flux d'assimilats vers les tissus méristématiques en croissance et une diminution des matières fraîche et sèche au niveau des feuilles, mais aussi au niveau des tiges et des racines (Hernandez et al., 2000). Une réduction des teneurs en chlorophylle (Meloni et al., 2003) suite à l'augmentation des teneurs des chlorures à des doses toxiques au niveau des vieilles feuilles, associée à l'augmentation de la résistance stomatique, va entraîner une diminution de l'activité photosynthétique et sera à l'origine de la réduction de la croissance (Munns, 2002). Cette réduction de la teneur en chlorophylle ne peut être perçue qu'à partir de vingt jours de stress salin.

L'action du sel dans la plante commence par des accumulations des ions au niveau des différents compartiments à des doses toxiques avant d'affecter le fonctionnement de la plante. Pour la plus part des plantes, les ions Na^+ et Cl^- sont exclus par les racines au fur et à mesure que l'eau est absorbé du sol. La remontée du sel dans les parties aériennes de la plante peut être à l'origine de la réduction de l'ouverture stomatique. Cependant, il a été observé que l'activité photosynthétique par unité de surface foliaire peut rester inchangée même en cas de fermeture stomatique (James et al., 2006). Ce paradoxe peut être expliqué par des changements au niveau de la taille des cellules qui se rétrécit ainsi que par une augmentation de la densité des chloroplastes. Si des quantités de Na^+ ou Cl^- deviennent excessives, cela va entraîner une réduction de la surface foliaire et par la suite une limitation des flux de carbone vers les méristèmes et les zones de croissance (Munns, 2010). Cela est à l'origine de jaunissements, des nécroses et de l'apparition de points de brûlure sur les feuilles et finalement la chute foliaire. Rochdi et al. (2004) ont observé que l'effet inhibiteur de NaCl sur la croissance ne passe pas obligatoirement par une perturbation de leur alimentation en eau. Par ailleurs, la toxicité du NaCl observée chez le *Citrus aurantium* est fréquemment associée à des teneurs foliaires élevées en Cl^- (Walker et al., 1984) mais elle résulte aussi de l'accumulation excessive de Na^+ (Fernandez-Ballester et al., 1998). Or, depuis longtemps, il est apparu que les espèces d'agrumes les moins tolérantes sont celles qui accumulent le plus de Cl^- dans leurs feuilles (Chapman, 1968). De même, Greenway et al. (1980) ont montré que les ions chlorures sont beaucoup plus vite absorbés par les plantes que les ions sodium. L'analyse minérale a aussi révélée que l'accumulation du chlorure varie en fonction de l'organe. L'intensité des dégâts foliaires, l'abscission et la photosynthèse chez les porte-greffes sont associées aux teneurs accumulées en Cl^- (Banuls et al., 1990) et aucune corrélation statistique ni de relation simple ne relie la teneur foliaire en sodium et les effets négatifs de la salinité (Romero-Aranda et al., 1998).

En résumé, la réponse des plantes à la salinité se fait selon deux phases : une rapide, la phase osmotique qui inhibe la croissance des jeunes feuilles, et une phase plus lente, ionique qui accélère la sénescence de feuilles matures (Munns et Tester, 2008). La première phase débute immédiatement après que la concentration en sel au niveau racinaire atteint le seuil critique. Le taux de croissance des pousses est significativement réduit. La réduction de l'expansion des feuilles après cet accroissement de la salinité est due dans un premier lieu à l'effet osmotique du sel au niveau des racines. La deuxième phase correspond à l'accumulation du sel à des doses toxiques au niveau des feuilles matures (caractérisée par l'arrêt de l'expansion foliaire et l'incapacité à diluer les sels, contrairement à ce qui peut être observé au niveau des feuilles jeunes) puis leurs sénescences. Si le pourcentage de sénescence des feuilles matures est supérieur au taux de production de nouvelles feuilles, l'activité photosynthétique sera dans l'incapacité de subvenir au besoin en carbohydrates des jeunes feuilles qui voient leur croissance réduite (Munns et Tester, 2008). Il est donc généralement considéré que la diminution de croissance végétative, exprimée que ce soit par la réduction du nombre de feuilles ou bien de la surface foliaire, représente généralement la première réponse aux génotypes exposées au stress salin (Munns et al., 1986). Les plantes exposées à des contraintes salines se voient subir des modifications de leur métabolisme afin de s'adapter aux changements imposés par l'environnement. Le stress salin modifie les traits morphologiques, physiologiques et biochimiques des plantes. Cet effet peut être lié à des perturbations de concentrations des régulateurs de croissance: acide abscissique et cytokinines (déséquilibre hormonal). L'accumulation de l'acide abscissique dans les tissus végétaux vient comme une réponse au stress osmotique provoqué par le sel. Ce composé semble être un médiateur entre la perception du stress et de la synthèse d'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxyliques responsable de la production d'éthylène et de l'abscission des feuilles (Gómez-Cadenas et al., 1996, Gómez-Cadenas et al., 1998).

Une étude réalisée par Bouaouina et al. (2000) a pu mettre en évidence que l'impact de la salinité est perçu en premier lieu au niveau des racines. Pour ces auteurs, la partie racinaire serait plus affectée par la salinité que la partie aérienne. Pour s'adapter au stress salin, la plante réduirait en premier lieu le développement de son système racinaire de manière à préserver la partie aérienne, devant maintenir et assurer la production de photosynthétats. Pour faire face à ce problème, les agrumes répondent par une surproduction d'osmolytes compatibles tel que la proline afin de réduire le potentiel hydrique dans les tissus foliaires (Gómez-Cadenas et al., 1998).

b. Salinité et expression génique

La salinité est à l'origine des changements liés à l'expression du transcriptome, des taux de protéines, ou des concentrations de métabolites (Munns, 2010). Afin de maintenir son statut hydrique, la plante maintient le sel en mouvement des racines jusqu'aux parties aériennes : l'augmentation de la teneur en ions sodium (Na^+) dans les feuilles stimule la fermeture des stomates pour maintenir une rétention hydrique optimale, le Na^+ reste stocké dans les grandes vacuoles des cellules foliaires ou sera recircularisé dans les tissus conducteurs. Toutefois, il est à noter que l'internalisation du Na^+ dans les vacuoles a un coût métabolique et nécessite le pompage actif des protons (H^+) à l'extérieur de la vacuole (Berthomieu et al., 2003).

De point de vue pratique, la forte présence de NaCl est à l'origine d'un remaniement conséquent de l'homéostasie: le Na^+ , par compétition, réduit l'absorption d'ions potassium (K^+) dans la cellule, pénètre dans le cytoplasme à travers des transporteurs puis déclenche la réponse au stress suite à une augmentation de la concentration d'ions calcium (Ca^{2+}) cytosolique (Yokoi, et al., 2002 ; Seki et al., 2002 ; Rock et al., 2010). Le Ca^{2+} va alors activer les cascades de phosphorylation des MAP kinases, aboutissant à l'activation des gènes Salt Overly Sensitive (SOS) et des gènes de biosynthèse des osmolytes (Yokoi et al., 2002 ; Rock et al., 2010). La voie SOS est activée de la manière suivante: le Ca^{2+} active la protéine SOS3 qui se lie alors à la protéine SOS2. Le complexe ainsi formé va induire simultanément, l'activation de la protéine SOS1 qui est un antiport Na^+/H^+ de la membrane plasmique, et l'activation de l'antiport Na^+/H^+ exchanger (NHX1) de la vacuole (Zhu, 2002 ; Katiyar-Agarwal et al., 2006 ; Gill et al., 2010). La force protomotrice, indispensable au flux d'ions à travers la membrane et donc à l'homéostasie, est générée par des pompes à protons. A la pénétration des ions Na^+ et le Cl^- dans le cytosol, les pompes à protons ATP (ou PPi) dépendantes situées sur la membrane plasmique et sur le tonoplaste vont rétablir l'homéostasie ionique, en abaissant les concentrations de Na^+ et de Cl^- cytosoliques. Ces ions sont soit évacués hors du cytoplasme vers les tissus conducteurs par l'intermédiaire d'antiport Na^+/H^+ (NHA1) et de canaux Cl^- , soit stockés dans la vacuole par l'intermédiaire de l'antiport Na^+/H^+ (NHX1 ou AtNHX1), de canaux Cl^- (CLCd ou AtCLCd) et d'antiport Cl^-/H^+ (Hasegawa et al., 2000 ; Zhu, 2001). L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique permet de diminuer les effets toxiques liés au stress salin et d'établir la transduction du signal afin d'accomplir l'adaptation aux conditions de stress. Cette adaptation concerne l'accumulation de métabolites compatibles de façon proportionnelle aux variations de potentiel osmotique externe. Ils permettent l'ajustement osmotique en abaissant le potentiel osmotique interne par captage des

molécules d'eau à leur surface. Ils diminuent ainsi les perturbations métaboliques par leur apport en carbone et en azote lors du stress. De plus, toujours dans le but de réguler son potentiel hydrique, la plante peut faire varier la conductivité hydraulique au niveau de la racine et des feuilles. Ceci se produit au niveau des membranes cellulaires, des vésicules internes ou du tonoplaste, par régulation de l'ouverture des aquaporines (protéines présentes dans les membranes et facilitant le transport de l'eau) ou par modification de leur quantité (Tyerman et al., 2002). Les gènes identifiés à ce jour comme étant importants dans la tolérance au sel sont divers et se regroupent dans les catégories des transporteurs d'ions, de solutés compatibles ou d'osmolytes, et des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la croissance (Munns, 2010). Diverses approches ont été utilisées avec succès pour identifier gènes candidats dans la tolérance à la salinité:

1. Les transporteurs de sodium identifiés grâce QTL HKT pour l'exclusion de Na^+ , à savoir SKC1, Nax1, Nax2 et KNA1.
2. Les gènes liés à la membrane plasmique antiport Na^+ / H^+ du SOS1 et le transporteur Na^+ AtHKT1
3. Le transporteur K^+ HKT1, l'antiport vacuolaire NHX1 Na^+ / H^+ , le Na^+ -ATPase PpENA, et la glycine osmoprotectrice bêtaïne.

c. Mécanismes de tolérance à la salinité chez les agrumes

L'identification de stratégies qui améliorent la résistance à la salinité des génotypes est d'un grand intérêt agronomique et économique (Fernandez-Crespo et al., 2012). Hussain et al. (2012) ont montré que les mécanismes de la tolérance au stress salin chez les génotypes d'agrumes utilisés comme cultivars demeurent encore mal connus dans la mesure où différentes stratégies d'adaptation semblent être mises en œuvre. Les réponses adaptatives peuvent être regroupées (Figure 13): (a) l'homéostasie qui comprend l'homéostasie ionique et l'homéostasie osmotique ou ajustement osmotique; (b) limitation des dégâts du stress et réparation des dommages cellulaires causés par le stress, ou détoxification et (c) contrôle de la croissance (coordination de la division cellulaire et extension à des niveaux appropriés aux conditions de stress) (Zhu, 2001).

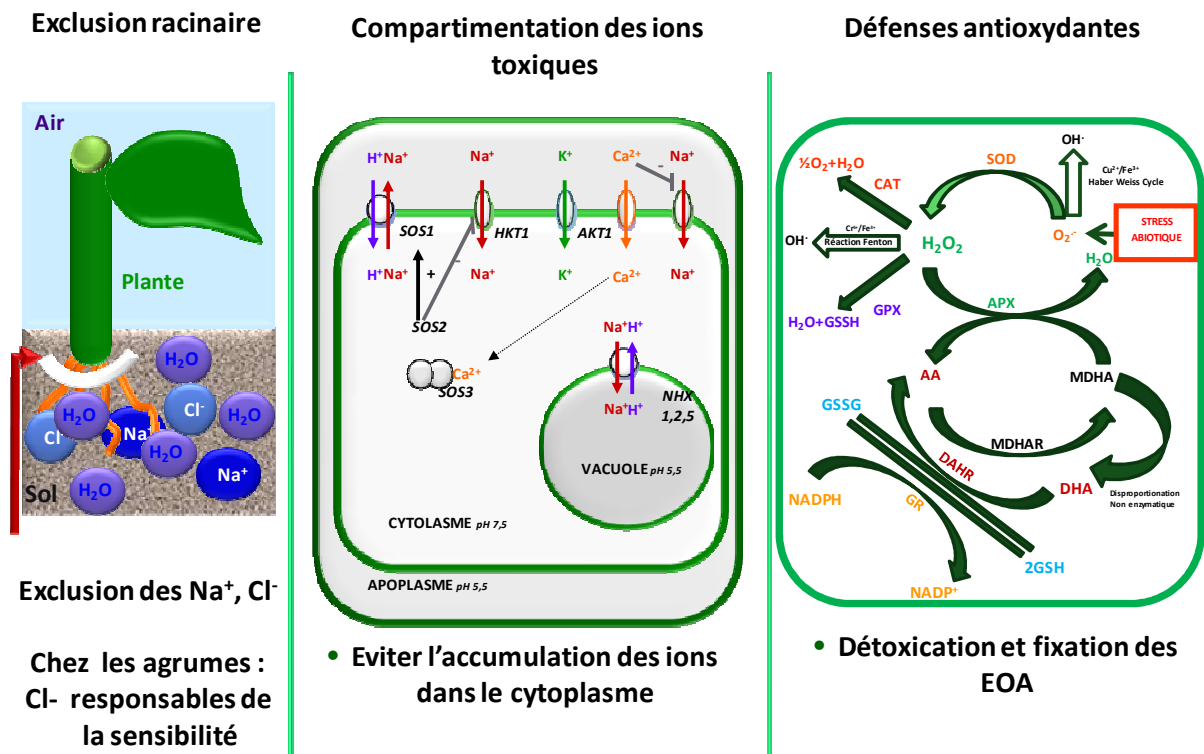


Figure 13 : Stratégies d'adaptation au stress salin (Ben Yahmed, 2013)

Pour le premier point, l'homéostasie régule négativement les réponses de la désintoxication et permet de réduire les dégâts liés au stress. De plus, l'homéostasie associée à la désintoxication cellulaire permet d'acquérir une meilleure tolérance au stress (Zhu, 2002) (Figure 14).

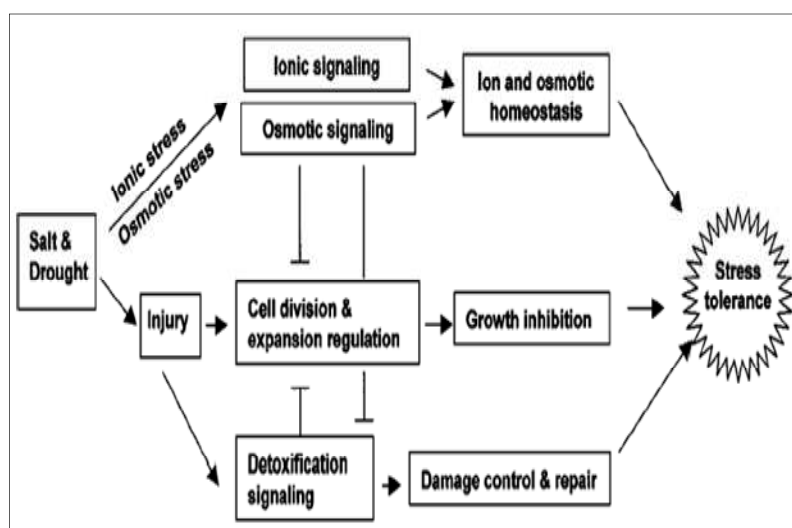


Figure 14 : Délimitation fonctionnelle des voies de signalisation au stress (Li et Assmann, 2010)

L'induction de réponses d'acclimatation est mise en évidence suite à l'application du stress sur des géotypes présentant différents degrés de sensibilité au stress. Ces traits de tolérance peuvent être reliés à des caractères morphologiques (la vigueur (Gueta-Dahan et al., 1997)), physiologique (l'efficacité d'utilisation de l'eau) et l'absorption des chlorure (Moya et al., 2002) mais aussi les réponses biochimiques qui permettent de réduire les dommages causés par le stress, ou faciliter la réparation des systèmes endommagés (Mittler, 2002). Cela peut être aussi une conséquence de l'amélioration de la résistance au stress oxydatif et de la bonne efficacité du système antioxydant par l'intermédiaire de l'augmentation de l'activité enzymatique et le changement du profil des acides gras permettant de protéger le fonctionnement photosynthétique (Arbona et al., 2007 ; Santini et al., 2012).

Des études comparatives ont montré que le mandarinier Cléopâtre, utilisé en tant que porte-greffes, présente une tolérance aux conditions de stress hydrique (Gimeno et al., 2009) et au stress salin (Hussain et al., 2012). Moya et al. (2002) ont montré, dans une étude comparant le comportement du mandarinier Cléopâtre au Citrange Carrizo en condition de stress salin, que la cinétique d'absorption du sel est proportionnelle à la cinétique de transpiration. Ils ont pu noter que chaque modification de la transpiration provoque des changements au niveau des taux de chlorures foliaires. De plus, l'absorption des chlorures diminue beaucoup plus rapidement chez le mandarinier Cléopâtre par rapport au Carrizo. Il ont prouvé que la tolérance du mandarinier Cléopâtre est également liée au fait que ce géotype est capable d'exclure plus efficacement les chlorures au niveau racinaire. De plus, la sur-régulation de la Cu-SOD et Mn-SOD en condition de stress chez la Cléopâtre contribue à minimiser les effets des EOA et collaborer ainsi à la tolérance à la salinité de ce géotype. Arbona et al. (2003) ont montré que malgré le fait que Citrange Carrizo est considéré comme un porte-greffe sensible à la salinité comparativement à d'autres porte-greffes la réponse antioxydante au stress salin semblait éviter des dommages cellulaires importants.

Une étude similaire réalisée également sur le mandarinier 'Cléopâtre' et le 'Citrange Carrizo' a permis d'observer des fortes diminution de l'activité photosynthétique et des valeurs de la conductance stomatique chez la Cléopâtre (Brumos et al., 2010). Le photosystème II demeure non endommagé, en condition de stress, et cela a été associé à la répression des processus métaboliques centraux telle que l'utilisation du carbone. L'analyse du transcriptome a permis de mettre en évidence une forte répression de l'expression des gènes impliqués dans l'activité photosynthétique chez le mandarinier Cléopâtre (Brumos et al., 2010). Ces résultats semblent en accord avec une étude récente réalisée par Podda et al. (2013). Ces auteurs se sont intéressés à la comparaison de la tolérance au sel des mandariniers

‘Cléopâtre’ et ‘Willow leaf’. Ils ont montré que ces deux mandariniers présentait des comportements opposés en condition de stress. Chez le mandarinier Cléopâtre, le sel induit une régulation des protéines responsables de la chaîne de transport des électrons (protéines liées à l’activité photosynthétique). Une diminution de l’activité de la phosphoribulokinase a été observée chez le mandarinier ‘Willow leaf’. Pour les auteurs, cette diminution pourrait être liée à la plus forte sensibilité de ce génotype aux conditions de salinité, se manifestant par l’inhibition de cycle de Calvin et la fixation du carbone. D’un autre côté, le H_2O_2 produit par des procédés de photo-respiration est récupéré par la catalase dont l’activité se voit augmenter lors d’un stress salin chez le mandarinier ‘Willow leaf’. Simova-Stoilova et al. (2010) ont signalé que l’activité de la CAT augmente chez les variétés de blé sensibles en période de sécheresse. Ce mode d’adaptation peut être considéré comme étant une stratégie adoptée par les mandariniers doux tel que ‘Willow leaf’ pour combattre les effets négatifs causés par le stress salin.

i. Compartimentation intracellulaire

La toxicité des ions chlorures constitue le principal facteur impliqué dans les réponses moléculaires des feuilles des agrumes en condition de stress salin (Storey et Walker, 1999 ; Moya et al., 2003 ; Brumos et al., 2010). Storey et Walker (1999) ont pu mettre en évidence chez les agrumes que la variation génétique de la tolérance à la salinité est corrélée avec l’accumulation des ions chlorures chez les *Citrus*. Idéalement, les ions Na^+ et Cl^- devraient être largement séquestrés dans la vacuole de la cellule. Ainsi, l’augmentation de l’efficacité de la compartimentation intracellulaire pourrait expliquer les différences entre génotypes dans la tolérance à la salinité. Hussain et al. (2012) ont observé que la faible teneur des chlorures foliaires peut être utilisée comme un indicateur de tolérance au stress salin au sein de la diversité des agrumes. Toutefois, il n’existe pas de corrélation entre la concentration en ions et la tolérance au sel (Masood et al., 2012). En effet, l’ajustement osmotique est l’un des principaux mécanismes permettant la survie et la croissance des plantes en conditions de stress salin. Certains génotypes sont capables d’accumuler de grandes quantités de sels dans leurs tissus en assurant des ajustements osmotiques via des compartimentations de ces ions dans la vacuoles et la production des solutés (compatibles ou osmotiques) dans le cytoplasme (Gorham et al., 1985). D’autres ont montré que certains génotypes présentent des chutes de feuilles qui sont ensuite associées à l’émergence de nouvelles feuilles. Ces constations ont été notées chez le pomelo ‘Star ruby’ et le kumquat ‘Marumi’. Pour Hussain et al. (2012) , ces caractéristiques particulières sont probablement liées à des mécanismes spécifiques. Ces auteurs considèrent que le comportement d’adaptation au stress de ces génotypes pourrait être

considéré comme un mécanisme de défense qui implique une action évasive consistant à éliminer les feuilles ayant fortement accumulées des ions toxiques et ensuite produire de nouvelles feuilles dans le but de maintenir la croissance des plantes ainsi que la photosynthèse (Arbona et al., 2003; Iglesias et al., 2007; Arbona et al., 2009).

ii. *Exclusion racinaire*

Les plantes ont développé différents mécanismes d'adaptation pour atténuer les effets de la salinité (Sairam et al., 2006). Entre ceux-ci l'exclusion du sel est considérée comme la plus importante fonction d'adaptation des plantes (Munns et Tester, 2008). Les racines présentent une certaine plasticité vis-à-vis des signaux liés au développement et à l'environnement (Li et al., 2010). L'accumulation du sel dans les racines constitue un processus très important pour l'ajustement osmotique. Arbona et al. (2003) rapportent que chez les agrumes, les génotypes sensibles à la salinité accumulent plus de Cl^- et Na^+ dans les feuilles alors que les génotypes tolérants à la salinité accumulent plus de Cl^- et Na^+ dans les racines pour mieux s'adapter à la salinité. En effet, les réponses physiologiques des agrumes, dans le but de contourner les effets du stress salin, sont reliées à la capacité des plantes à restreindre le transport des chlorures des racines vers les parties aériennes (Iglesias et al., 2007). Le transport passif de Cl^- vers le xylème est réalisé à travers plusieurs canaux ioniques. Ces canaux sont sous-régulés par l'ABA. Les fortes doses d'ABA permettront de limiter le transport des chlorures vers les rameaux en conditions de sel. Il a été observé chez les porte-greffes de vigne, que les racines semblent constituer le premier et principal lieu où se déroulent les mécanismes d'ajustement et de régulation de croissance afin de pouvoir faire face au stress (Sharp et Davies, 1979 ; Rubinigg et al., 2004). Bouaouina et al. (2000) ont montré que la résistance du système racinaire au stress salin peut être due à une diminution de l'allocation du carbone pour la croissance foliaire au profit de la croissance racinaire (Brugnoli et Bjorkman, 1992). Au niveau physiologique, l'arrêt de croissance peut être considéré comme un moyen de préserver les carbohydrates pour le métabolisme (et le développement durable,) et de constituer des réserves énergétiques nécessaires à la reprise de croissance suite à la levée du stress (Bartels et al., 2005). Walker et al. (2002) ont montré que, chez la vigne, la tolérance à la salinité peut être influencée par la distribution des racines et peut impliquer la contribution de l'exclusion de chlorure.

XI. Stress Oxydatif

Un stress oxydatif peut être induit par le stress abiotique (cas d'un stress salin ou d'un stress hydrique, (Deng et al., 2012) ou par des stress biotiques (Gratao et al., 2005). Il résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces actives de l'oxygène EOA et les défenses antioxydantes. A faible concentration, les EAO interviennent comme des promoteurs de la croissance et de développement de la plante. A forte dose, ils causent la sénescence et la mort cellulaire (Deng et al., 2012; Joseph et Jini, 2011). L'intensité du stress est déterminée par le taux des EOA se trouvant au niveau cellulaire (efficacité du système antioxydant). Il a été démontré que les balances entre la production et la détoxification des radicaux libres oxygénés dépendent du degré de tolérance des génotypes au stress abiotique (Liu et Zhang, 2004) (Figure 15).

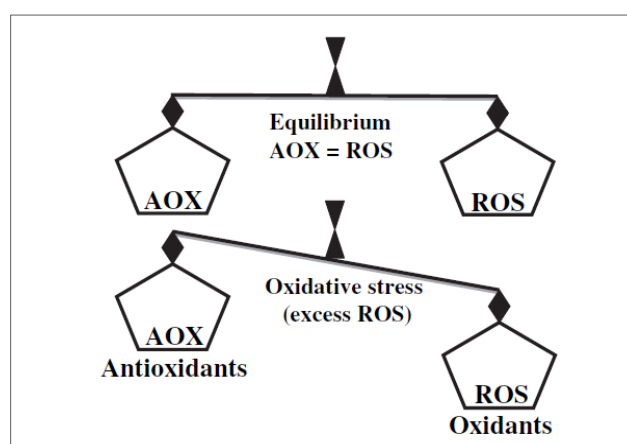


Figure 15 : Equilibre entre les EOA et le système antioxydant (Gill et Tuteja, 2010)

Des études récentes suggèrent que ces espèces actives de l'oxygène jouent un rôle très important dans l'activation du système antioxydant par l'initiation de l'expression de nouveaux gènes et la transduction du signal (Gill et Tuteja, 2010) afin de protéger les membranes contre les dommages oxydatifs (Ahmedizadeh et al., 2011). Cela laisse penser que les cellules ont développé des stratégies pour l'utilisation des EOA comme des stimulus biologiques ou des signaux qui activent et contrôlent les différents gènes responsables de la réponse au stress (Gill et Tuteja, 2010).

Sur le plan pratique, l'accumulation de l'ABA suite à un stress salin induit la fermeture stomatique qui réduit par la suite la disponibilité du CO₂ dans les feuilles et inhibe la fixation du carbone (Gueta-Dahan et al., 1997). Cela conduit à la réduction de l'efficacité de la photosynthèse. Dans ces conditions, l'exposition des chloroplastes à un excès d'énergie

entraîne une augmentation de la production des EOA. Les EOA sont généralement produits dans différents compartiments cellulaires dès lors que le potentiel redox du compartiment cellulaire est modifié. Les mitochondries (complexe I (ubiquinone) et complexe III de la chaîne de transport des électrons (ETC)) et les chloroplastes (photosystèmes I et II (PSI et PSII)) sont les compartiments cellulaires dont l'activité métabolique est la plus oxydante (Gill et Tuteja, 2010). Ils représentent ensemble la source majeure des EOA dans les cellules végétales. Dans la mitochondrie, la réduction de la chaîne de transport des électrons est à l'origine de la synthèse de l' O_2^- en condition de stress (Ben Ahmed et al., 2010). Dans les autres compartiments cellulaires, les EOA proviennent de l'activité des peroxydases membranaires telles que la glycolate oxydase (peroxysomes), l'oxalate oxydase et les amines oxydases (apoplaste) (Walters, 2003) et la NADPH oxydase (cytosol) (Lamb and Dixon, 1997). L'augmentation de la concentration des EOA entraîne l'activation d'une cascade de réactions (Joseph et Jini, 2011). Sur le plan ionique, le Ca^{2+} accumulé dans le cytosol suite à l'accumulation du sel active la NADPH oxydase qui, par le moyen de son flavocytochrome multimérique, agit comme une chaîne de transport d'électrons et réduit l' O_2 en O_2^- selon la réaction suivante (Figure 16) :

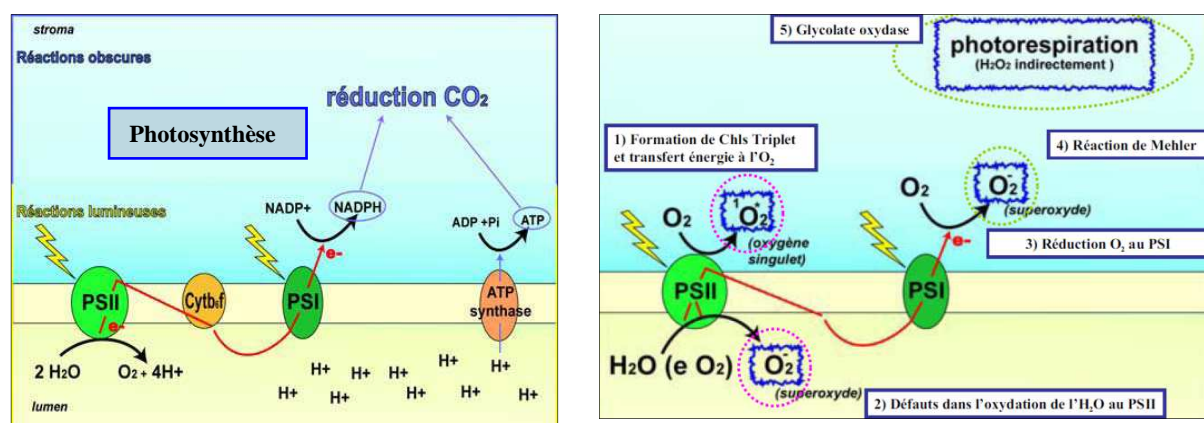
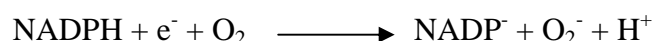


Figure 16: Perturbation de la photo-respiration et production des EOA (Laloi, 2010)

La production d'un radical superoxyde O_2^- va induire la synthèse d'autres EOA tels que les radicaux hydroxyles OH^\cdot et l'oxygène singulet 1O_2 (Joseph et Jini, 2011). Etant chargé, le radical O_2^- ne diffuse pas à travers les membranes, sa détoxification est compartimentée dans les zones de production. Au cours de l'élimination du radical O_2^- , une réaction catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est formé. Le H_2O_2 constitue la

forme la plus stable des EOA (Ahmedizadeh et al., 2011) permettant de réduire les dommages membranaires (Eraslan et al., 2007). Ce H_2O_2 diffuse rapidement à travers les membranes via notamment les aquaporines pour atteindre d'autres compartiments et rejoindre le cycle de l'ascorbate-glutathion. Au cours de ce cycle, l'élimination de H_2O_2 sera à l'origine d'une oxydation du glutathion et une réduction de l'ascorbate. Ces deux réactions seront catalysées par l'ascorbate peroxydase (APX) et la glutathion reductase (GR) et surtout la GPX (Glutathion Peroxydase)(Joseph et Jini, 2011) (Tableau 3). D'un autre côté, le H_2O_2 participera en tant que second messenger dans les cascades de signalisation déclenchées lors des mitoses (Foyer et Noctor, 2005) et en réponse aux stress (Mullineaux et al., 2000). De ce fait, l'accumulation du H_2O_2 peut être considérée comme une indication d'une forte pression oxydative. L'ampleur des dégâts causés par le stress oxydatif peut donc être estimée par des dosages des produits de la détoxification (incluant le H_2O_2). Des recherches réalisées dont le but de comprendre l'effet du stress sur les plantes ont permis de mettre en évidence une réduction des taux des composés antioxydants et de l'activité enzymatique de l'ensemble des enzymes de détoxification en condition de stress. Ces mêmes auteurs, (Joseph et Jini, 2011), ont prouvé que la différence notée dans l'activité photosynthétique entre génotypes, résultant à l'application d'un stress photo-oxydative, est due essentiellement à des différences dans le statut oxydatif (Santini et al., 2012). D'un autre côté, Arbona et al. (2003) rapportent que les effets néfastes observés sur les plantes, suite à l'application d'un stress salin, sont dus essentiellement à une intoxication par des ions chlorures et non pas à l'induction d'un stress oxydatif par le sel. Il a été aussi rapporté que la salinité promeut également l'expression de certains gènes particuliers chez les agrumes (Ben-Hayyim et al., 2001). Néanmoins, la réponse spécifique des agrumes au stress oxydatif induit par la salinité demeure encore mal connue.

L'augmentation de l'activité enzymatique de l'ensemble des enzymes antioxydantes, sous des conditions de stress salin ou stress hydrique, peut être un indicateur de la surproduction des EOA et amène à la mise en place de la machinerie antioxydante pour réduire les dommages causés par le stress oxydatif (Meloni et al., 2003).

Tableau 3: Rôle des enzymes de détoxification (Gill et Tuteja, 2010)

Enzymatic antioxidants	Enzyme code	Reactions catalyzed
Superoxide dismutase (SOD)	EC 1.15.1.1	$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Catalase (CAT)	EC 1.11.1.6	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$
Ascorbate peroxidase (APX)	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Guaicol peroxidase (GPX)	EC 1.11.1.7	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$
Monodehydroascorbate reductase (MDHAR)	EC 1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)^+$
Dehydroascorbate reductase (DHAR)	EC 1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$
Glutathione reductase (GR)	EC 1.6.4.2	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$

1. Les catégories d'EOA

Les EAO sont des espèces oxygénées qui regroupent d'un côté les dérivés non radicalaires (ne possédant pas d'électron célibataire) comme l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'un autre côté les radicaux libres qui sont des atomes ou molécules dont la structure chimique est caractérisée par la présence d'un électron libre rendant cette espèce chimique beaucoup plus réactive que l'atome ou la molécule dont il est issu (Jabnoun, 2010) tels que l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ou le radical hydroxyle (OH^\cdot) (Halliwell, 2006)(Figure 17).

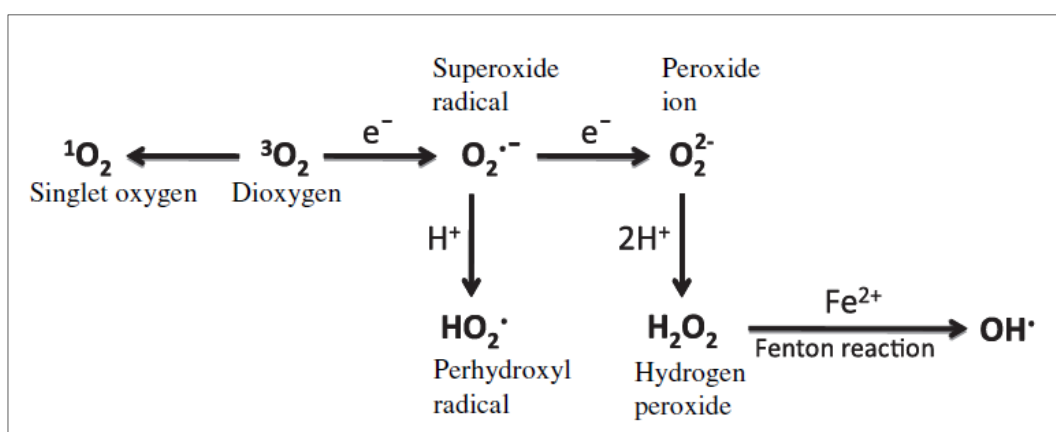


Figure 17: Production des EOA (Gill et Tuteja, 2010)

a. Dérivés non radicalaires

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) : Tout stress environnemental qui engendre une fermeture des stomates et diminue la concentration intercellulaire en CO_2 (C_i) peut favoriser la formation de $^1\text{O}_2$ (Gill et Tuteja, 2010). En effet, la dissipation de l'énergie en excès au niveau du PSII aboutit à la formation d'un état triplet de la chlorophylle qui réagit avec l'oxygène pour donner de l' $^1\text{O}_2$. Ce dernier est considéré comme le principal responsable de l'inhibition du PSII (Krieger-Liszkay et al., 2008).

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) : Le peroxyde d'hydrogène joue un rôle important au niveau cellulaire et participe dans le métabolisme de la plante (par exemple la biosynthèse de la paroi cellulaire) ainsi qu'il intervient dans de nombreuses voies de signalisation de stress, réponse pathogène et mort cellulaire programmée ou à effet hormonal (Fedina et al., 2009). Cependant, l' H_2O_2 peut également être converti en radical hydroxyle par la réaction de Fenton provoquant la peroxydation des lipides, la dégradation des protéines et l'endommagement de l'ADN.. Ces radicaux interagissent avec les acides gras polyinsaturés et entraînent une

peroxydation des membranes lipidiques. Le H_2O_2 peut également être directement métabolisé par la glutathion peroxydase au niveau de l'apoplaste et par la catalase (CAT) dans le peroxysome (Gratao et al., 2005).

b. Radicaux libres oxygénés

L'anion superoxyde (O^{2-}) : Les anions superoxyde (oxygène moléculaire ionisé par addition d'un électron supplémentaire) sont des radicaux libres de durée de vie très brève. Ces ions sont très toxiques pour les molécules biologiques, en particulier les acides gras polyinsaturés, sur lesquels ils provoquent des peroxydations en chaîne (Jabnoun, 2010). La réduction de l'oxygène en O^{2-} se produit dans la chaîne de transfert des électrons des chloroplastes au niveau du PSI mais également dans d'autres compartiments cellulaires. La toxicité de cette molécule réside donc dans sa capacité à réagir avec H_2O_2 pour former le radical hydroxyle (OH^\cdot) via la réaction d'Haber-Weiss (Moller et al., 2007).

Le radical hydroxyle (OH^\cdot) : Le radical hydroxyle (OH^\cdot) est considéré comme l'espèce réactive de l'oxygène la plus toxique en raison de son pouvoir fortement oxydant. Il peut réagir avec toutes les molécules biologiques y compris l'ADN, les protéines, les lipides et la plupart des constituants cellulaires. Il n'existe aucun mécanisme enzymatique qui permet d'éliminer cette molécule. Sa forte production aboutit à la mort de la cellule (Apel et Hirt, 2004).

2. Toxicité des EOA

Les espèces réactives de l'oxygène EOA peuvent réagir avec les constituants cellulaires et engendrer l'oxydation des lipides, des protéines, des pigments, de l'ADN et d'autres molécules (Jabnoun, 2010) (Figure 18).

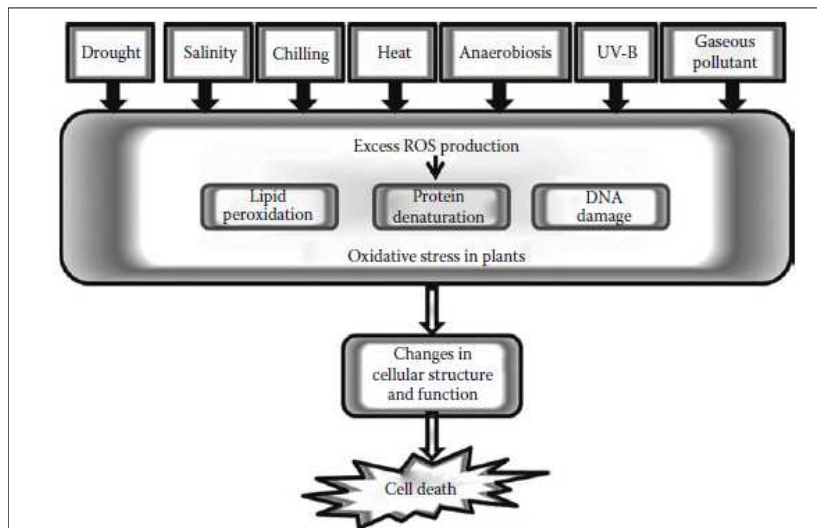


Figure 18: Rôle du stress abiotique dans la production accrue des EAO à l'origine des dommages oxydatifs (Nagarajan et Nagarajan, 2010)

a. Oxydation des protéines

Les protéines peuvent être modifiées par les EAO (Gill et Tuteja, 2010) ou bien par des mécanismes secondaires résultant de la réaction des EAO avec d'autres constituants cellulaires comme les lipides. L'oxydation peut être directe se produisant au niveau de la chaîne latérale des acides aminés ou bien par la fixation d'aldéhydes issus de la peroxydation lipidique sur les acides aminés, formant ainsi des adduits (Lynch et al., 2001). D'après Favier (2003), les protéines oxydées deviennent très hydrophobes (suppression des groupes amines ionisables ou extériorisation des zones hydrophobes centrales qui vont alors former des amas dans les cellules). Dans tous les cas, l'oxydation des protéines est irréversible, la protéine oxydée devient plus sensible à l'action des protéases et sera éliminée par le protéasome (complexe enzymatique multi protéique).

b. Oxydation des acides nucléiques

Les dégâts au niveau de l'ADN sont dus essentiellement à l'ion OH^\cdot qui agit au niveau de la base purique et pyrimidique ainsi qu'au niveau du désoxyribose (Gill et Tuteja, 2010). Ces dommages de l'ADN se traduisent par des perturbations cellulaires telles qu'une diminution de la synthèse des protéines, une destruction de la membrane cellulaire et des dommages de protéines photosynthétiques qui affecteront la croissance et le développement de la plante. La molécule d'ADN, une fois endommagée, ne peut pas être remplacée et doit être réparée (Tuteja et al., 2001). En revanche, si les lésions persistent du fait de l'ampleur des

dommages, des erreurs de lecture et de synthèse de l'ADN causent une mutation ponctuelle dans le génome, ce qui conduira à l'apoptose (Favier, 2003).

c. Peroxydation des acides gras polyinsaturés

Les lipides membranaires sont des acides gras polyinsaturés. Ces lipides sont très sensibles à cause de leur double liaison qui peut être facilement attaquée par les EOA. Les EOA provoquent des oxydations de ces acides gras polyinsaturés ce qui aboutit à la formation de très nombreux produits primaires (hydroperoxydes) et secondaires (aldéhydes). Ce phénomène de peroxydation lipidique tend à rendre les acides gras plus hydrophiles ce qui va altérer la structure et le fonctionnement des membranes cellulaires notamment en augmentant leur perméabilité à des substances qui ne sont pas normalement capables de les franchir (Moller et al., 2007; Gill et Tuteja, 2010).

XII. Les systèmes antioxydants

La plante a développé un système de défenses antioxydantes (de type enzymatiques et non enzymatiques) (Figure 19) afin d'assurer la détoxification et la fixation des EOA (Joseph et Jini, 2011). Ce système est activé par les fortes concentrations de ces radicaux oxygénés au niveau cellulaire (Ahmadizadeh et al., 2011).

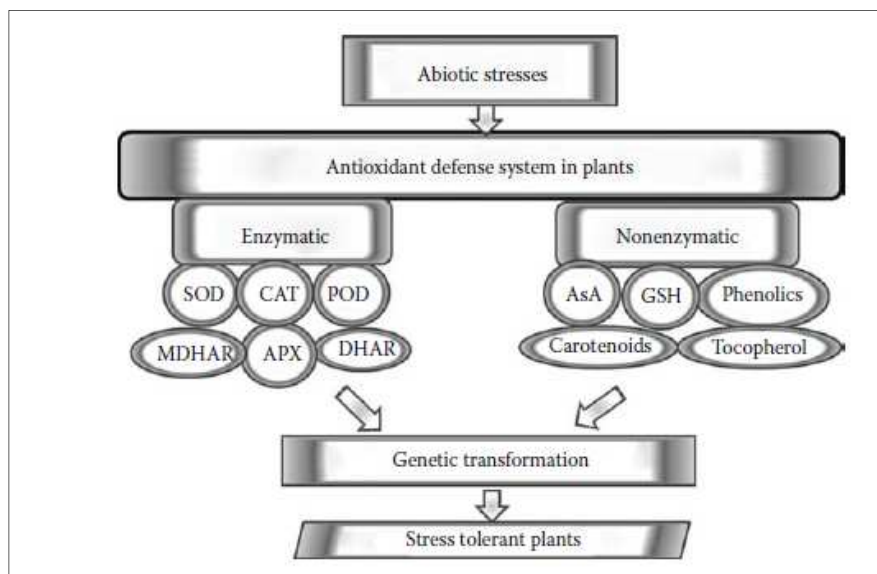


Figure 19 : Système de défense antioxydant : les composants enzymatiques et non enzymatiques (Joseph et Jini, 2011)

Il a été démontré que la tolérance au stress salin est corrélée à l'efficacité des machineries des défenses antioxydantes en réponse au stress oxydatif chez plusieurs plantes cultivées (Gosset et al., 1994, Santos et al., 2001). Les génotypes tolérants présentent une limitation du stress oxydatif qui est associée à une augmentation rapide de l'activité des enzymes CAT (Catalase), SOD (Superoxyde Dimustase) et APX (Ascorbate Peroxydase) et l'action des molécules antioxydantes (Santini et al., 2012). Il a été également observé que l'extension des effets du stress oxydatif n'est pas liée à la tolérance des agrumes mais au temps nécessaire à la plante pour produire des métabolites (Arbona et al., 2007).

Les principales enzymes de détoxification sont la SOD, la CAT, l'APX et la GR (Glutathion Reductase), MDHAR (Monohydroascorbate Reductase), DHAR (Deshydroascorbate Reductase), GPX (Glutathion Peroxydase) (Gill et Tuteja, 2010) (Figure 20). Ces enzymes sont localisées dans différents compartiments de la plante (Joseph et Jini, 2011)

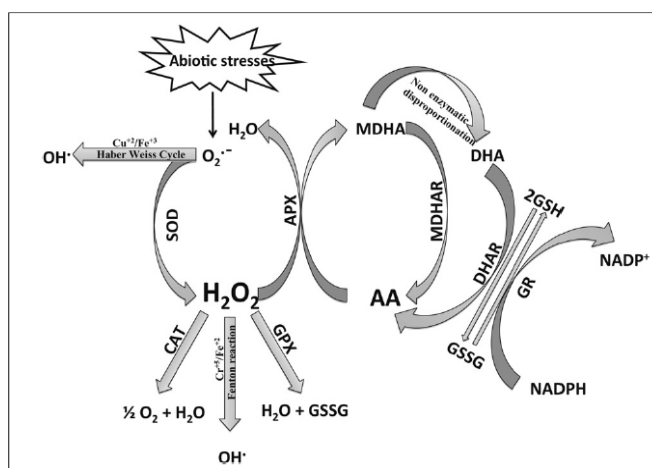


Figure 20: Les EOA et les systèmes enzymatiques antioxydants (Gill et Tuteja, 2010)

Les molécules antioxydantes (système non enzymatique) sont très diverses. On peut citer à titre d'exemples les molécules importantes dans la neutralisation des EOA : les ascorbates, les caroténoïdes, les tocophérols et les flavonoïdes.

1. L'effet du stress abiotique sur le système de défense oxydatif

L'étude de Amirjani (2010), sur le soja, montre que pour une concentration de 50 mM de sel, l'activité des enzymes demeurent inchangées par rapport au témoin. Pour cet auteur, cette concentration n'entraînerait pas de stress oxydatif majeur. De même, une réduction

significative de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et POD) n'a pu être observée que lorsque les plants sont soumis à des concentrations de 100 et 200 mM de NaCl.

En cas de stress, la plante produit un grand nombre d'iso enzymes. La synthèse de ces protéines est modulée en fonction des signaux émis par les métabolites responsable de la mobilisation des EOA (Dietz et al., 2006). Liu et al. (2012) ont pu mettre en évidence que le stress salin provoque une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes qui inclue la CAT, la POD et la SOD ainsi que la production de H_2O_2 au niveau des racines de l'haricot rouge (*Phaseolus vulgaris* L.) lors d'un stress salin de 100 mM. Chez les fruits de mandariniers soumis à un stress oxydatif induit par le froid, il a été observé que l'intensité des dommages oxydatifs est réduite par l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes incluant la SOD, CAT et APX (Sala et Lafuente, 1999). Ces même auteurs, (Li et al., 2012), ont pu constater qu'en condition témoin, l'activité des enzymes antioxydantes (APX, POD et CAT) et le contenu en EAO (H_2O_2 et $O_2^{\cdot-}$) augmentent d'une façon constante au cours de la période de culture (à l'exception pour l'activité de la SOD). Cependant, l'activité enzymatique et le contenu en EAO augmentent rapidement du jour 0 au jour 6 en condition de stress salin, puis diminue. Après 10 jours de stress, l'activité enzymatique antioxydante et le contenu en EAO restent constants. De plus, les génotypes ayant une forte pression oxydative en condition témoin présentent une réponse rapide de la machinerie antioxydante une fois que la plante est soumise à un stress (Arbona et al., 2007). Kartashov et al. (2008) ont montré que les plantes qui présentent une intense activité des peroxydases et des taux élevés de proline présentent une bonne acclimatation aux conditions de stress (jusqu'à 100 mM de NaCl pendant 24h). D'autres études réalisées sur le coton, le prunier, la tomate, le riz et le maïs ont montré que, dans les conditions salines, l'activité des enzymes de détoxification s'accroît au niveau des branches et des racines (Kim et al., 2005 ; Joseph et Jini, 2011). L'étude réalisée par Ahmedizadeh et al. (2011) sur plusieurs génotypes de blé dur montre une augmentation de la concentration en SOD et en CAT comme réponse aux conditions de stress. Ces derniers suggèrent que les génotypes qui présentent des activités en SOD et CAT élevés sont les plus résistants à l'action du stress et montrent un système antioxydant plus performant. Cependant, il a été montré que les plantes présentant des taux élevés de MDA (Malondialdéhyde) sans montrer de symptômes peuvent supporter l'effet du stress oxydatif (Arbona et al., 2007).

2. Régulation de l'expression des gènes responsable de la tolérance au stress

La surexpression des gènes responsables de l'activité enzymatique doit être maintenue tout au long de la période de stress sinon ce trait de tolérance, liée à l'efficacité de la

machinerie de détoxification, ne peut être considérée comme un facteur d'adaptation à la salinité (Moya et al., 2002).

Il a été démontré aussi, pour l'olivier, que la capacité à réguler l'expression des enzymes antioxydantes constitue la principale approche pour l'adaptation au stress hydrique (Ben Ahmed et al., 2010). Ces mêmes auteurs ont prouvé que l'augmentation des taux des enzymes de détoxification est due essentiellement à un excès d'énergie intercepté par les pigments photosynthétiques (Figure 21).

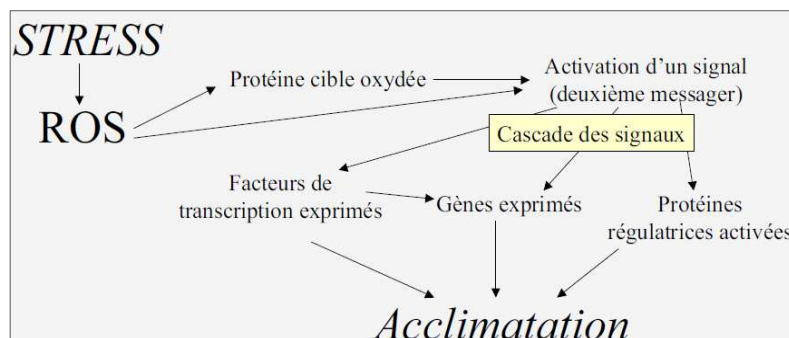


Figure 21: Stress et systèmes antioxydants (Laloi, 2010)

3. Système de défense enzymatique

i. Super oxyde dimustase (SOD)

Dans le cycle de l'ascorbate-glutathion, ou le cycle de Halliwell-Asada (Asada, 1994), deux enzymes clés interviennent dans la détoxification des radicaux oxygénés. La principale enzyme est la SuperOxyde Dimustase (SOD, EC 1.15.1.1), qui catalyse la réaction d'élimination des radicaux superoxydes et constitue la première ligne de défense contre la toxicité des radicaux oxygénés. Trois groupes de SOD peuvent être distingués en fonction du cofacteur fixé au niveau de leur site active (Tableau 4):

- Cu/Zn-SOD présente dans la matrice mitochondriale et le peroxysome. Une surexpression de cette enzyme chez le tabac transgénique améliore la tolérance au stress hydrique (Gill et Tuteja, 2010).
- Mn-SOD présente dans le cytoplasme et les chloroplastes. La surexpression de cette enzyme chez des plants d'*Arabidopsis* transgénique augmente la tolérance au stress (Gill et Tuteja, 2010).
- Fe-SOD présente dans les chloroplastes (Joseph et Jini, 2011 ; Gill et Tuteja, 2010).

Il a été démontré grâce à différentes études réalisées sur le riz, que l'activité de la SOD s'accroît en cas d'un stress hydrique ou salin (une surexpression d'*OsMT1a* qui illustre une

tolérance au stress hydrique) (Khalifa et al., 2011 ; Gill et Tuteja, 2010). La surexpression de la Mn-SOD chez des plants d'*Arabidopsis* transgénique en cas de stress salin, ainsi qu'une surexpression de la Cu/Zn-SOD chez des plants de tabac transgénique seraient à l'origine de la tolérance aux différents stress (Gill et Tuteja, 2010). De plus, une corrélation a pu être mise en évidence entre l'activité de la SOD et l'activité de la CAT (Khalifa et al., 2011). Cette corrélation résulte du fait que la SOD est responsable de la synthèse de l' H_2O_2 et que l'augmentation de la concentration en H_2O_2 est corrélée à l'activité de la CAT (Eraslan et al., 2007). Cette dernière molécule sera réduite en oxygène et eau grâce à une réaction catalysée par la catalase (CAT) (Ahmedizadeh et al., 2011). Il a été démontré qu'une forte induction de la SOD et de la CAT et un maintien de l'activité de l'APX pendant 24 heures, en condition de stress, entraîne une faible accumulation du H_2O_2 et de MDA. Et que l'augmentation de l'activité de la SOD est due essentiellement à une surproduction du $\text{O}_2^{\cdot -}$ (réduction du taux d'oxygène) (Blokhina et al., 2003). Hernandez et al. (1995) ont pu montrer qu'en condition de stress, on constate l'augmentation de l'activité de la SOD et de l'APX au niveau de la mitochondrie et le chloroplaste. Néanmoins, l'étude réalisée par Gueta-Dahan et al. en 1997 sur la réponse des agrumes à la situation de stress salin montre que la salinité engendre une augmentation de l'activité de la SOD et pas forcément celle de l'APX et que l'apport exogène d'ABA n'entraîne pas l'induction de ces deux enzymes. Des études similaires ont montré que la réduction de l'activité de la SOD, sous des conditions de stress, peut résulter d'une inhibition par le H_2O_2 . Cette inhibition est à l'origine d'une réduction de la détoxification des ions $\text{O}_2^{\cdot -}$. Les travaux sur la SOD confirment que la réduction de l'activité de la SOD lors d'un stress hydrique peut être due soit à une dégradation de l'enzyme ou bien à une réduction de la synthèse. En outre, des résultats contradictoires ont été obtenus en ce qui concerne l'effet de la salinité et le stress hydrique sur l'activité enzymatique. Pour le radis, le sel induit l'expression des enzymes ayant une forte homologie avec l'ascorbate peroxydase (Lopez et al., 1994). De plus, il a été rapporté en condition de stress hydrique, une augmentation au niveau des feuilles de l'activité de la Mn-SOD mitochondriale et Cu/Zn-SOD chloroplastique chez les cultivars tolérants tandis que l'activité de la Cu/Zn-SOD cytosolique reste inchangée (Hernandez et al., 1995). Pour les cultivars sensibles, l'activité de l'APX et celle de la SOD chloroplastique restent inchangées, tandis que les SOD cytosolique et mitochondriale voient leurs activités diminuées par le sel. Dans les feuilles de *Vigna unguiculata*, le sel réduit l'activité de la Mn-SOD et la cAPX, alors que celle de l'APX chloroplastique demeure inchangée (Hernandez et al., 1994). Les données concernant les différents isozymes de la SOD et de l'APX montrent que s'il y a une diminution de l'activité d'un isozyme, l'activité des

autres isozymes se voient aussi être diminuée (Hernandez et al., 1995). Aucune donnée n'a pu être trouvée pour prouver le contraire c'est-à-dire en condition de stress une augmentation de l'activité pour un isozyme correspondra à la diminution de l'activité d'un autre isozyme. On peut supposer que, sous conditions de stress sévère, si l'activité est inhibée par le sel, une répression de l'ensemble du métabolisme de la plante peut être observée.

Tableau 4: Les différentes SOD et leur localisation dans la cellule (Gill et Tuteja, 2010)

SOD isozymes	Location	Resistant to	Sensitive to
Fe-SOD	Chloroplast	KCN	H ₂ O ₂
Mn-SOD	Mitochondria and Peroxisomes	KCN and H ₂ O ₂	—
Cu/Zn-SOD	Chloroplast and Cytosol	—	H ₂ O ₂ and KCN

ii. *Catalase (CAT)*

La catalase est une hème protéine tétra métrique impliquée dans l'élimination de H₂O₂ (Joseph et Jini, 2011). Willekens et al. (1997) ont indiqué que la catalase joue un rôle important dans la défense antioxydante des cellules végétales dans des conditions de stress. Ils ont également pu estimer que la réduction de l'activité photosynthétique à plus de 50% dans les feuilles adultes en condition de stress ayant une faible activité de la catalase. Cela a été démontré suite à plusieurs études établies sur les plantes transgéniques du riz, ces études ont montré que la CAT est à l'origine d'une tolérance aux différents stress abiotique (une surexpression de l'enzyme est à l'origine de la tolérance au stress abiotique conséquence de la neutralisation du H₂O₂) (Khalifa et al., 2011 ; Gill et Tuteja, 2010). De plus, il a été prouvé qu'une surexpression du couplet SOD et CAT permet une meilleure adaptation à des taux élevés de SO₂ (Tseng et al., 2007 ; Gill et Tuteja, 2010). Dans la même ligne de recherche, Gondim et al. (2012) ont montré l'augmentation des taux de la CAT, APX et GPX en condition de stress suite à l'augmentation de la concentration du H₂O₂ et que le taux de la CAT est de 21 à 90 plus élevé que celui de l'APX et la GPX. En effet, une bonne coordination peut exister entre la CAT et l'APX. Parfois, une augmentation de l'activité de la CAT est perçue même en absence d'un apport de H₂O₂ (Khalifa et al., 2011). Cela indique une bonne capacité à mobiliser le H₂O₂ (Arbona et al., 2007). Dans certains cas et en condition de stress, l'activité de la CAT se voit être réduite pour stimuler la synthèse d'autres enzymes (cas de génotype tolérant) ou bien se voit être réduite à cause d'une sensibilité au stress (comme conséquence à l'accumulation du H₂O₂ (chez les génotypes sensibles)) (Joseph et Jini, 2011).

En outre, un taux élevé de MDA a été déterminé chez les plantes ayant de faible activité de la CAT et vice versa. L'effet protecteur des enzymes pour éviter l'accumulation du MDA a été observé chez plusieurs cultures sous des conditions de stress salin (Gondim et al., 2012).

iii. Glutathion réductase (GR)

La GR est une protéine flavo-oxydoréductase (Romero-Puertas et al., 2006 ; Gill et Tuteja, 2010). C'est l'enzyme qui catalyse le cycle de l'GSSG-GSH (Figure 22). Elle joue ainsi un rôle essentiel dans le système de défense contre les EOA en maintenant le GSH sous sa forme réduite. Elle est localisée principalement dans les chloroplastes mais aussi on la trouve dans les mitochondries et le cytosol (Edward et al., 1990 ; Gill et Tuteja, 2010).

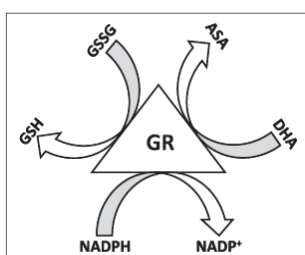


Figure 22 : Rôle de la glutathion réductase (Gill et Tuteja ,2010)

Bashir et al. (2007) ont étudié l'expression des gènes et l'activité de la GR chez les graminées dans le cas d'une déficience en fer. L'étude a été réalisée sur des isolats de clones d'ADNc sur la GR chloroplastique (*HvGR1*) et la GR cytosolique (*HvGR2*) de l'orge. Les résultats ont montré que l'activité spécifique de *HvGR1* était 3 fois plus élevée que celle de *HvGR2*. L'expression des gènes *GR1* et *GR2* a été analysée chez le riz, le blé, l'orge et le maïs et les résultats montrent une régulation positive (une surexpression des gènes) des *HvGR1*, *HvGR2* et *TaGR2* en réponse à une déficience en fer.

iv. Ascorbate peroxydase (APX)

L'APX est généralement localisé au niveau du peroxysome (Gimeno et al., 2009). Elle assure la réduction des taux de H_2O_2 , le principal inhibiteur de la photosynthèse, en eau en utilisant l'ascorbate comme un donneur d'électrons (Ben Ahmed et al., 2010) (Figure 23).

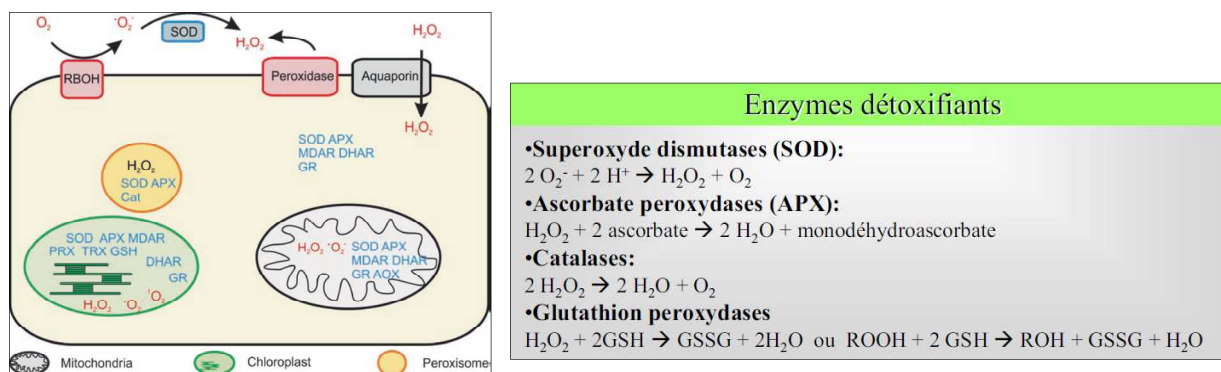


Figure 23: Récapitulatif des réactions antioxydantes (Rock et al., 2010)

Il a été démontré en comparant l'activité de l'APX chez les cultivars sensibles et tolérants que l'APX joue un rôle déterminant dans la sensibilité des agrumes aux contraintes abiotiques (Gueta-Dahan et al., 1997). Parmi les 4 enzymes analysées, il est apparu que l'augmentation de l'activité de l'APX chez les cultivars tolérants semble être la plus significative pour l'acquisition de la tolérance à la salinité. Sharma et Dubey (2005) ont pu prouver que les plantes soumises à un stress modéré présentent une activité de l'APX plus importante que leurs contrôles respectifs. Cependant, un stress sévère engendre une réduction de taux de cette enzyme. De même, il a été démontré que la surexpression de l'APX au niveau du chloroplaste chez la *Nicotiana tabacum* est à l'origine d'une meilleure tolérance au stress. L'étude de l'expression de gène de l'APX a été réalisée sur les racines de *Oryza sativa* sous des conditions de stress salin. L'analyse a porté sur les niveaux d'ARNm de deux APX cytosolique (*OsAPX1* et *OsAPX2*), deux APX au niveau du peroxysome (*OsAPX3* et *OsAPX4*), et quatre APX chloroplastique (*OsAPX5*, *OsAPX6*, *OsAPX7* et *OsAPX8*). Ces dernières ont été quantifiées dans le génome du riz. Les résultats trouvés ont montré que des concentrations de 150mM et 200mM de NaCl étaient à l'origine d'une augmentation de l'expression de *OsAPX8* mais aucun effet n'a été noté sur l'expression de *OsAPX1*, *OsAPX2*, *OsAPX3*, *OsAPX4*, *OsAPX5*, *OsAPX6*, et *OsAPX7* dans les racines du riz (Hong et al., 2007 ; Gill et Tuteja, 2010). La surexpression de *OsAPXa* ou *OsAPXb* chez l'*Arabidopsis* transgénique améliore la tolérance au sel (Lu et al., 2007 ; Gill et Tuteja, 2010).

v. *Glutathion peroxydase (GPX)*

Les GPX sont fortement induites par l'ensemble des stress abiotiques (Gimeno et al., 2009). La GPX joue un rôle important les défenses oxydatives de la plante. Son rôle reste régulier mais secondaire dans la mobilisation du H_2O_2 à cause de la faible capacité à éliminer

les EOA comparativement à la CAT (Gondim et al., 2012). En effet, elle utilise le GSH comme réducteur afin de pouvoir réduire les hydroperoxydes organiques et le H_2O_2 et ainsi permettre une meilleure adaptation au stress oxydatif (Noctor et al., 2002 ; Gill et Tuteja, 2010).

Gill et Tuteja (2010) ont pu montrer une surexpression du gène *GPxh* responsable de la synthèse de la GR chez la *Chlamydomonas reinhardtii* sous des conditions stress oxydatif. Ce gène est fortement induit par l'ion O^{2-} . De plus, il a été prouvé que la surexpression du GPX, étudié sur le tabac transgénique, est à l'origine d'une meilleure tolérance au stress (Gimeno et al., 2009).

vi. Les Peroxydases

Les génotypes ayant une forte activité de la peroxydase présentent une meilleure adaptation au stress oxydatif. Une telle activité ne peut être observée chez les génotypes sensibles (Scalet et al., 1995). L'augmentation de l'activité de la SOD sans l'augmentation de la capacité à mobiliser le H_2O_2 entraîne une cyto-toxicité générée par les radicaux hydroxyles (Gossett et al., 1994). L'augmentation de l'activité de la GPX est un indicateur de la grande capacité de la décomposition du H_2O_2 produit par la SOD.

vii. Glutathion S Transferase (GST)

Cette enzyme est impliquée dans la détoxification des produits issus de la peroxydation des lipides. Elle permet de protéger la cellule des EOA et des dommages causés par le stress (Chan et al., 2004 ; Crarazolle et al., 2011).

4. Système de défense non enzymatique : les molécules antioxydantes

Le système antioxydant non enzymatique joue un rôle important dans les défenses antioxydantes. Il est à noter que les enzymes antioxydantes deviennent inactives dès le démarrage de la sénescence. Donc, un système antioxydant non enzymatique performant améliorera la tolérance de la plante vis-à-vis du stress (Deng et al., 2012). D'un autre côté, l'accumulation des molécules antioxydantes permettra de protéger les enzymes antioxydantes des dégâts causés par les radicaux hydroxyles (Deng et al., 2012). L'accumulation des osmolytes dans les cellules soumises à un stress est associé à la mise en marche de mécanismes de tolérance aux effets néfastes du déficit hydrique (Pirzad et al., 2011)

i. Le glutathion et l'ascorbate

Le tri peptide glutathion est considéré comme le principal métabolite intracellulaire induit par le stress oxydatif pour la lutte contre les EOA. Il exige la présence abondante du GSH sous sa forme réduite pour accomplir son rôle oxydatif (Figure 24).

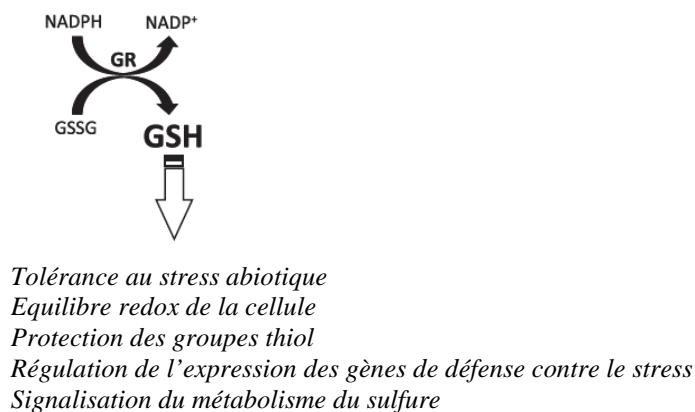


Figure 24 : Rôle du la glutathion dans le métabolisme de la plante (Gill et Tuteja, 2010)

En effet, le glutathion joue un rôle clé dans les défenses antioxydantes en régénérant une autre molécule antioxydante (ASH) via le cycle ASH-GSH (Foyer et al., 1976 ; Gill et Tuteja, 2010). Il a été démontré que lorsque l'effet du stress s'intensifie, la concentration du GSH se voit être réduite. Il en résulte un état oxydé de la cellule qui est à l'origine d'une détérioration de cette dernière (Tausz et al., 2004 ; Gill et Tuteja, 2010).

Cet antioxydant est présent dans l'ensemble des compartiments cellulaires (dans le cytosol, le reticulum endoplasmique, la mitochondrie, les chloroplastes, la vacuole peroxysome ainsi que les aploplastes) (Del Rio et al., 2003 ; Gill et Tuteja, 2010). Il joue différents rôles dans plusieurs processus physiologiques et surtout il intervient dans la régulation de l'expression des gènes comme réponse à un stress oxydatif (Mullineaux et al., 2005 ; Gill et Tuteja, 2010).

Son rôle est primordial dans les chloroplastes car il participe dans la protection du système chloroplastique contre les dommages causés par le stress oxydatif. La surexpression du gène chloroplastique γ -glutamylcystéine synthetase (γ -ECS) entraîne une augmentation du taux du GSH (3 fois plus). Paradoxalement, une augmentation de la concentration du GSH dans les chloroplastes engendre une meilleure tolérance au stress oxydatif (Creissen et al., 1999 ; Gill et Tuteja, 2010). Le rapport entre le taux de la forme réductase sur le taux de la

forme oxydase de cette molécule constitue un indicateur majeur dans l'évaluation de l'état redox des tissus de la plante.

ii. *La proline*

Cet osmoprotecteur non enzymatique possède un bon potentiel inhibiteur et il est considéré comme indispensable pour la plante afin de contrecarrer l'effet des EOA en conditions de stress (Chen et Dickman, 2005 ; Gill et Tuteja, 2010). Le dosage de cette protéine est considéré comme un critère de sélection de la tolérance au stress. Elle participe comme osmolyte à la rétention de l'eau dans le cytoplasme ainsi qu'elle protège contre la dessiccation des membranes et la dénaturation des protéines (Ben Ahmed et al., 2010). La synthèse de la proline se fait via D1-pyrroline-5-carboxylate (*P5C*). Cette réaction est catalysée par le D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) (Pirzad et al., 2011) et le D1-pyrroline-5-carboxylate reductase (*P5CR*) (Verbruggen et Hermans, 2008 ; Gill et Tuteja, 2010). Le gène *P5CS* est induit par le stress hydrique et son induction est généralement corrélée à l'accumulation de la proline. La surexpression du *P5CS* a été décrite au départ chez le tabac et puis l'étude s'est étendue sur l'ensemble des agrumes. La tolérance induite par la surexpression du gène inclut l'ajustement osmotique au niveau du cytosol et la mobilisation des radicaux libres oxygénés (Gimeno et al., 2009). Il a été démontré que la surexpression de *P5CS* chez la tomate transgénique entraîne l'augmentation du taux de cette molécule sous conditions de stress salin (Hamida-Sayari et al., 2005 ; Gill et Tuteja, 2010). Il a été observé que l'apport de la proline entraîne une augmentation de l'activité de la SOD et la POD, ce qui contribue à l'amélioration de la tolérance des cultivars à la salinité (Huang et Guo, 2005).

iii. *Le Tocophérol*

Le tocophérol est un lipide soluble antioxydant considéré comme un fixateur potentiel des EOA et des radicaux lipidiques oxygénés (Hollander-Czytko et al., 2005 ; Gill et Tuteja, 2010). L'action antioxydante se manifeste au niveau de la biomembrane des chloroplastes en fixant $^1\text{O}_2$. Il existe 4 isozymes de tocophérol. Le α tocophérol présente l'activité antioxydante la plus active grâce à la présence de 3 groupements méthyles dans sa structure moléculaire (Kamal-Eldin, 1996 ; Gill et Tuteja, 2010). Il a été démontré suite à des études récentes que le stress oxydatif active les gènes responsables de la synthèse du tocophérol (Wu et al., 2007 ; Gill et Tuteja, 2010). Srivastava et al. (2005) ont montré l'induction du gène responsable de la synthèse de α tocophérol lors de l'application d'un stress salin.

iv. *Les caroténoïdes*

Les caroténoïdes sont des lipides solubles antioxydants jouant un rôle très important dans la tolérance au stress abiotique (Sieferman-Harms, 1987 ; Gill et Tuteja, 2010) (Figure 25)

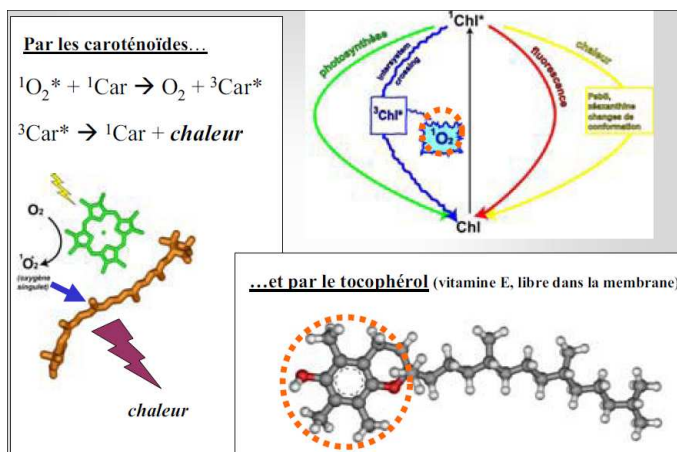


Figure 25: Fixation des EOA par les caroténoïdes (Laloi, 2010)

v. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes interviennent en tant que molécules antioxydantes qui assurent la fixation des EOA produits lors d'un stress et neutralisent ainsi leurs effets avant la manifestation de dégâts oxydatifs au niveau cellulaire (Lovdal et al., 2010). Il a été observé que les gènes responsables de la biosynthèse des flavonoïdes sont également induits par le stress (Winkel-Shirley, 2002 ; Gill et Tuteja, 2010).

XIII. Problématique scientifique et objectifs

Les agrumes sont cultivés sous irrigation dans des régions où la salinité des eaux peut être assez élevée, comme c'est le cas dans de nombreux pays du bassin méditerranéen [Espagne, pays du Maghreb (Tunisie), Turquie, Syrie, ...]. Une mauvaise gestion des ressources en eau, comme par exemple, une irrigation non adaptée ou l'utilisation d'eau saumâtre, peut entraîner des baisses importantes de rendement et de qualité des productions. Il est donc nécessaire de limiter les manques d'eau d'empêcher l'augmentation des teneurs en sels des sols mais également de comprendre les mécanismes de résistance des porte-greffes d'agrumes et des variétés au stress salin et au déficit hydrique afin de sélectionner les génotypes les plus performants pour pouvoir créer les variétés plus adaptées possibles à l'effet des stress.

L'évaluation de la tolérance vis-à-vis de stress environnementaux de géotypes représentatifs de la diversité au sein des ressources génétiques peut fournir une information originale pour optimiser les schémas de création variétale. En effet, l'objectif commun des programmes d'amélioration des porte-greffes d'agrumes est de créer de nouveaux géotypes résistants ou tolérants aux maladies, d'accroître l'adaptabilité à différentes conditions de sols et d'environnement, mais également de transmettre aux greffons une productivité élevée, ainsi qu'une qualité et une taille supérieure des fruits.

Au cours de ce travail de thèse, il m'a été proposée : i) à partir d'une étude réalisée sur la diversité génétique large au sein du genre *Poncirus* de caractériser les propriétés de tolérance au déficit hydrique de géotypes représentatifs ; ii) à partir de données obtenues à l'IVIA sur la diversité au sein du groupe des mandariniers d'étudier les propriétés de tolérance au stress salin de géotypes représentatifs. Notre but principal était de vérifier s'il était possible de mettre en évidence l'existence de corrélations entre la diversité génétique identifiée et les propriétés de tolérance aux stress abiotiques

Au cours d'une première étude, nous avons caractérisé au moyen de marqueurs moléculaires SSR la diversité existante au sein du genre *Poncirus* de la collection d'agrumes de San Guiliano en Corse. Pour cela 74 accessions ont été analysées.

A partir des résultats obtenus, plusieurs questions se sont posées à nous :

- Est-il possible de corréler la diversité génétique mise en évidence avec des caractères phénotypiques particuliers ? Pour cela, nous avons étudié, en outre, la taille des graines produites, la surface des feuilles et des pétales des fleurs mais également les rendements en obtenus lors de l'utilisation de différents porte-greffes du genre *Poncirus* en association avec la clémentine.
- Est-il possible de corréler la diversité génétique mise en évidence avec des caractères d'adaptation au déficit hydrique ? Afin de répondre à cette question, nous avons sélectionné une dizaine d'accessions représentatives de la diversité existante au sein du genre *Poncirus*. Les plants ont subi un déficit hydrique et plusieurs paramètres physiologiques ont été étudiés.
- Enfin, est-il possible à partir des résultats obtenus d'identifier des accessions potentiellement plus adaptées au déficit hydrique et pouvant servir de parents dans le cadre de nos schémas de création variétale.

Dans un second temps, je me suis intéressée à l'étude du comportement en condition de stress salin de 16 accessions de mandariniers ayant des origines ancestrales différentes. Ces

accessions ont été soumises l'état non greffé à un stress salin pendant trois mois au cours desquels plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques ont été étudiés. Des comportements de tolérance très contrastés ont pu être mis en évidence.

A partir des résultats obtenus, plusieurs questions se sont posées à nous:

- Est-il possible de corréler la diversité génétique mise en évidence avec des caractères d'adaptation au stress salin?
- Une meilleure adaptation au stress salin implique-t-elle que les génotypes présentent obligatoirement au niveau racinaire des propriétés d'exclusion des ions toxiques (Cl^- et Na^+) ? Sinon, de meilleures capacités de détoxification ou de compartimentation de ces ions au niveau cellulaire dans les feuilles pourrait-il expliquer l'existence de ces génotypes tolérants?
- Enfin, est-il possible à partir des résultats obtenus d'identifier des accessions potentiellement plus adaptées au stress salin et pouvant servir de parents dans le cadre de nos schémas de création variétale pour les porte-greffes mais également pour la création de variétés.

Dans le cadre d'une troisième étude à caractère méthodologique, je me suis intéressée aux propriétés de tolérance au stress salin de rameaux isolés prélevés sur des mandariniers franc de pied. Les extrémités des rameaux ont été plongées dans une solution saline. Afin d'éviter de possibles phénomènes d'embolie, les extrémités des rameaux ont été redécoupées sous l'eau. Le stress salin a été appliqué pendant une semaine au cours de laquelle plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques ont été étudiés.

A partir des résultats obtenus, plusieurs questions se sont posées à nous :

- Au moyen de cette méthode, est-il possible de s'affranchir des propriétés d'exclusions des ions toxiques du compartiment racinaire et ainsi évaluer les propriétés de tolérance au sel de la partie aérienne d'une variété ?
- Une meilleure adaptation au stress salin implique-t-elle que les génotypes présentent obligatoirement une réduction de leur flux de transpiration afin de limiter l'afflux d'ions toxiques (Cl^- et Na^+) dans les feuilles ? Sinon, de meilleures capacités de détoxification ou de compartimentation de ces ions au niveau cellulaire dans les feuilles pourrait-elle expliquer la meilleure tolérance de génotypes pouvant toutefois présenter des concentrations en sel élevées dans les feuilles?

- Enfin, est-il possible à partir des résultats obtenus d'identifier des variétés de mandariniers potentiellement plus adaptées au stress salin et pouvant servir de parents dans le cadre des schémas de création variétale ?

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal

1. Etude de la diversité au sein du genre *Poncirus* (*Poncirus trifoliata* Raf.) : Caractérisation moléculaire et évaluation des propriétés de tolérance au déficit hydrique

a. Analyse de la diversité génétique et phénotypique des génotypes appartenant au genre *Poncirus*

74 génotypes de *Poncirus trifoliata* ont été sélectionnés pour l'analyse de la diversité génétique et phénotypique du genre *Poncirus* (tableau 1). L'ensemble du matériel génétique est originaire de la collection INRA-CIRAD de la station de recherche de San Giuliano en Corse. Deux autres espèces d'agrumes, utilisés en tant que référence, ont été ajoutées au groupe *Poncirus* : un oranger doux (*C. sinensis* Osbeck.) et un citrandarin (*C. reshni* x *P. trifoliata*) (Tableau 1).

b. Caractérisation de la tolérance au déficit hydrique de génotypes *Poncirus* représentatifs de la diversité

Parmi les 74 génotypes sélectionnés pour l'étude de la diversité, dix génotypes de *Poncirus* représentatifs de la diversité mise en évidence au moyen de 17 marqueurs moléculaires SSR, ont été sélectionnés et évalués en condition de déficit hydrique. Les graines ont été semées dans un substrat neutre (perlite). Les semis ont ensuite été repiqués 3 mois après la germination dans des pots de 3 litres et placés en serre pendant 9 mois supplémentaires (Tableau 2). Une fertilisation régulière a été appliquée selon Allario et al. (2011).

2. Caractérisation de la tolérance au stress salin de 16 accessions représentatives de la diversité existante au sein du groupe des mandariniers

Seize génotypes de mandariniers représentatifs de la diversité de ce groupe d'agrumes ont été sélectionnés (tableau 3). L'ensemble du matériel végétal est originaire de la collection INRA-CIRAD de la station de recherche de San Giuliano en Corse. Les graines ont été semées dans un substrat neutre (perlite). Les semis ont été repiqués 4 mois après la germination dans des pots de 3 litres et une fertilisation régulière a été appliquée selon Allario et al. (2011). Le niveau de ploïdie des plantules a été vérifié par cytométrie de flux (Partec I) (Froelicher et al., 2007). Les arbres ont ensuite été cultivés pendant 8 mois en serre dans des conditions contrôlées de température, d'humidité et sous une photopériode naturelle.

3. Etude des propriétés de tolérance au stress salin de rameaux isolés de mandariniers : une nouvelle méthode pour caractériser la tolérance au sel des variétés

L'expérimentation a été réalisée sur des rameaux isolés de 16 géotypes de mandariniers prélevés sur des plants témoins faisant partie de l'étude précédente.

Tableau 1 : Géotypes Poncirus sélectionnés pour l'analyse de la diversité

N°	Nom de la variété	Numéro Id	Origine	N°	Nom de la variété	Numéro Id	Origine
1	Algeria	ICVN-0110277	Algérie	38	Rusk	SRA-1037	USA SG
2	Argentine	SRA-1009		39	S.E.A.B.	SRA-1032	Algérie SG
3	Argentine	ICVN-0110079	Argentine SG	40	S.E.A.B.	ICVN-0110086	Algérie SG
4	Argentine	ICVN-0110275	Argentine SG	41	S.E.A.B.	ICVN-0110471	Algérie SG
5	Argentine	ICVN-0110276	Argentine SG	42	USDA	ICVN-0110415	USA
6	Benecke	SRA-1021	USA SG	43	Webber Fawcett	ICVN-0110136	USA
7	Benecke	SRA-1028		44	Yamagushi	SRA-1024	USA
8	Benecke	ICVN-0110083	USA SG	45	Yamagushi	ICVN-0110138	USA
9	Benecke	ICVN-0110089	USA	46	Commun	ICVN-0110133	Japon
10	Beneke	SRA-1008		47	Commun	SRA-935	
11	Brazil	ICVN-0110091	Brazil	48	English	SRA-1035	RSA
12	Christian	SRA-1023	RSA SG	49	English Dwarf	ICVN-0110098	USA
13	Christian	ICVN-0110085	USA SG	50	Feuille Moyenne	ICVN-0110412	Japon
14	Christian	SRA-1026	USA SG	51	Feuilles Grandes	ICVN-0110134	Japon
15	Christian	ICVN-0110084	Algérie SG	52	Flying Dragon	ICVN-0110104	USA
16	Christiansen	ICVN-0110094	USA	53	Flying Dragon	SRA-1003	
17	Davis	ICVN-0110095	USA	54	Flying Dragon	ICVN-0110101	USA
18	Ferme Blanche	SRA-1027	Algérie SG	55	Flying Dragon	ICVN-0110103	USA
19	Ferme Blanche	SRA-1039	Algérie	56	Jacobsen	ICVN-0110106	USA
20	Kryder	SRA-1022	USA SG	57	Jacobsen	SRA-1031	
21	Kryder	SRA-1029	RSA	58	Pomeroy	ICVN-0110278	France
22	Kryder	ICVN-0110108	USA SG	59	Rich 16-6	ICVN-0110122	USA
23	Grande fleurs	ICVN-0110111	USA	60	Rich 22-2	ICVN-0110123	USA
24	Luisi	ICVN-0110448	France SG	61	Rich 22-2	SRA-1005	
25	Menager	SRA-1030	France SG	62	Rubidoux	ICVN-0110127	USA
26	Menager	SRA-1020	France SG	63	Rubidoux	ICVN-0110128	USA
27	N°4	SRA-936		64	Rubidoux	SRA-1033	RSA SG
28	Pomeroy	SRA-996		65	Rubidoux SG	SRA-997	
29	Pomeroy	SRA-1040	USA SG	66	Towne	ICVN-0110132	USA
30	Pomeroy	ICVN-0110081	USA SG	67	Rich	ICVN-0110414	USA
31	Pomeroy	ICVN-0110119	USA SG	68	Towne	ICVN-0110131	USA
32	Pursha	SRA-1041		69	English Dwarf	ICVN-0110099	USA
33	Rich 12-2	ICVN-0110121	USA	70	Kryder 8-5	ICVN-0110109	USA
34	Rich 7-5	ICVN-0110124	USA	71	Variant	ICVN-0110139	France
35	Rubidoux	SRA-1038	USA SG	72	Rubidoux	SRA-1025	USA SG
36	Rusk	ICVN-0110437	USA SG	73	Holansis	ICVN-0110105	China
37	Rusk	SRA-1034	USA SG	74	Feuille Longue	ICVN-0110413	Japon

Tableau 2 : Génotypes choisis pour l'étude de l'effet du stress hydrique

Variété	Numéro Id	origine
Kryder	1029	RSA
Pomeroy	1040	USA SG
Pomeroy	110081	USA SG
S.E.A.B.	110086	Algeria SG
Commun	935	
Feuille Moyenne	110412	Japan
Flying Dragon	110101	USA
Jacobsen	110106	USA
Rubidoux	1033	RSA SG
Towne	110131	USA

Tableau 3 : Liste des génotypes mandariniers étudiés, leur origine génétique et le niveau de ploïdie

Nom commun	SRA	Nom latin	Groupe génétique, N	Niveau ploïdie (Poly / mono)
Ponkan	SRA 584	<i>C. reticulata</i>	1	Poly
Willowleaf	SRA 133	<i>C. deliciosa</i>	3	Poly
Beauty	SRA 411	<i>C. tangerina</i>	4	Poly
Cléopâtre	SRA 948	<i>C. reshni</i>	5	Poly
Principal groupe génétique, N (>10 %)				
Dancy	SRA 552	<i>C. tangerina</i>	1,4	Poly
Fuzhu	SRA 775	<i>C. erythroa</i>		
Nanfen Miguan	SRA 700	<i>C. reticulata</i>	1,2,3	Mono
San Hu Hong Chu	SRA 769	<i>C. erythroa</i>	1,2,3, <i>Papeda</i>	Poly
Bintangor Sarawak	SRA 683	<i>Bintangor</i>	1,3,4	Poly
Vietnam à peau fine	SRA 766	<i>C. kinokuni</i>	1,3,4,5	Poly
Temple	SRA 348	<i>C. temple</i>	1,4, <i>C. maxima</i>	Mono
Sun Chu Sha	SRA 786	<i>C. reticulata</i>	1,4,5	Poly
Shekwasha	SRA 982	<i>C. depressa</i>	1,5, <i>Papeda</i>	
Anana	SRA 652	<i>C. reticulata</i>	1, 3,5, <i>C. maxima</i>	
King of Siam	SRA 273	<i>C. nobilis</i>	inconnu, <i>Papeda</i>	Poly
Nasnaran	SRA 896	<i>C. amblycarpa</i>	4,5, <i>Papeda</i>	Poly

II. Dispositifs expérimentaux

1. Caractérisation de la tolérance au déficit hydrique des génotypes *Poncirus trifoliata* liés à la diversité

a. Analyse de la diversité génétique et phénotypique des génotypes appartenant au genre *Poncirus*

i. Analyse de la diversité génétique

Trois feuilles de chaque variété ont été prélevées en trois exemplaires pour assurer la reproductibilité des résultats de génotypage. L'ADN génomique total a été extrait à partir des feuilles selon le protocole de Doyle et Doyle (1987), modifié par Cabasson et al. (2001). 12 marqueurs SSR, issus du séquençage du génome du mandarinier (Froelicher et al., 2008), ont été utilisés pour cette analyse (06B07; 01E02; 07E12; 01h05; 07E05; 06A08; 05A05 et 01D11) et les amplifications ont été réalisées selon Kijas et al. (1997). Pour déterminer la structure de la diversité génétique et les relations entre les adhésions, nous avons marqué les allèles SSR au 8 loci pour chacun des *Poncirus* en codant la présence par (1) et l'absence par (0). La distance génétique entre chaque variété d'agrumes a été estimée en calculant l'indice de dissimilitude Dice (Dice, 1945) et la construction du dendrogramme UPGMA a été appliquée. Cette analyse a été réalisée avec le logiciel "Darwin" développé par le CIRAD (Montpellier, France).

ii. Analyse de la diversité phénotypique: surface foliaire, taille des fleurs et des graines

Pour chaque génotype, les fruits ont été récoltés au mois de Novembre et les graines ont été extraites à cette période. Les graines ont ensuite été séchées pendant 3 jours à température ambiante (environ 18°C) et HR = 85%. Pour chaque génotype étudié, 10 séries de 10 graines ont été pesées. La taille de la fleur et la surface foliaire ont été mesurées en Mars en mesurant le diamètre moyen des pétales et la taille des feuilles: 30 fleurs et 30 feuilles ont été récoltées pour chaque génotype.

*iii. Variabilité de la production de la clémentine en fonction de l'origine génétique du porte-greffes *Poncirus**

Afin de vérifier si l'origine génétique des porte-greffes *Poncirus* pouvait influencer sur la production de la clémentine, les données d'un essai porte-greffes ont été ré-analysées. Les données de la production de trois années consécutives (de la 10^{ème} année à la 12^{ème} année) ont été recueillies pour les groupes de *Poncirus* qui étaient génétiquement distincts.

b. Etude de comportement de génotypes *Poncirus* appartenant aux deux groupes génétiques identifiés vis-à-vis d'un déficit hydrique

L'expérience a été réalisée au cours de l'automne (mois d'octobre) dans des conditions contrôlées de température et d'humidité avec un régime de température de 15-19° C (la nuit) et 24-29° C (le jour), une humidité relative entre 60% à 85% et dans des conditions de

photopériode naturelle. 14 plants uniformes ont été retenus pour chaque génotype. Les plants ont été répartis par la suite en deux blocs, 7 plants pour le bloc témoin et 7 plants pour le bloc stressé. Le poids des pots a été homogénéisé (ajout de substrat si nécessaire) avant d'initier le stress pour l'ensemble des pots afin de pouvoir estimer plus facilement la consommation en eau de chaque génotype. Les plants ont été irrigués à la capacité au champ pendant les deux semaines qui précédaient le stress. Enfin, les plants du bloc stressé ont été couverts avec un isolant pour réduire l'évapotranspiration du sol (substrat, sable et gazon (1 :1 :1)).

La durée totale du stress a été estimée à 11 semaines. Trois feuilles ont été baguées à l'aisselle de chaque plant sur lesquelles ont été réalisées des mesures d'échange gazeux (conductance stomatique) de la fluorescence de la chlorophylle. Enfin, l'évolution du poids des pots a été déterminée au moyen d'une balance.

2. Caractérisation de la tolérance au stress salin de 16 accessions représentatives de la diversité existante au sein du groupe des mandariniers

Le stress a été réalisé d'Avril à Juillet dans des conditions de photopériode naturelle, et dans des conditions contrôlées de température et d'humidité avec respectivement une température jour / nuit de 19-32° C/16-18° C, et une humidité relative variant entre 60 et 85%. Pour l'expérimentation, dix plants uniformes ont été retenus pour chaque génotype, soit un total de 160 plantes. Les plants ont été divisés en deux blocs de 5 plants (5 stressés et 5 témoins). Trois feuilles à un même stade de développement situées dans la partie médiane des plants ont été baguées. Les plants ont été irrigués 2 fois par semaine avec 0.5 l d'une solution saline pour les plants stressés et avec de l'eau pure pour les plants témoins. Les concentrations en sel apportées ont régulièrement été augmentées : 30 mM de NaCl la 1^{ère} semaine, 50 mM la seconde semaine, 70 mM la troisième semaine et 90 mM les 8 semaines suivantes. Les pots ont été arrosés à la capacité au champ. Les mesures d'échange gazeux et de la teneur en azote ont été réalisées sur les feuilles baguées une fois par semaine entre 8h et 11h afin d'éviter les fortes températures. Le suivi de l'évolution de la hauteur des plants a été réalisé toutes les deux semaines. Des échantillonnages pour des dosages des chlorures foliaire et racinaire (prélèvement à la fin de la période de stress pour les racines) et de la pression osmotique foliaire ont été réalisés toutes les deux semaines. Des échantillons de feuilles ont été congelés à -80° C. A partir de ces échantillons des dosages des enzymes antioxydantes et des dosages de H₂O₂ ont été effectués. A la fin de l'expérimentation, des mesures de poids de racines et de la tige ont été faites afin de pouvoir estimer la vigueur des plants.

3. Caractérisation de la tolérance au stress salin de génotypes mandariniers à partir d'expériences réalisées sur des rameaux isolés

Pour cette étude, 9 rameaux (de 50 à 60 cm) issus de 9 plants indépendants ont été utilisés pour chaque génotype. Trois rameaux ont été considérés pour chaque génotype comme témoins et les six autres ont été soumis à un stress salin. Les rameaux ont été recoupés une deuxième fois sous l'eau (1 à 2 mm) pour éviter les phénomènes d'embolie.

L'expérience a été réalisée dans des tubes en verre contenant 50 ml d'eau pure pour les témoins et 50 ml d'une solution saline (50 mM). La durée du stress a été d'une semaine. L'évolution de la consommation en eau a été déterminée chaque jour pour les témoins. La quantité d'eau consommée par les témoins a été rajoutée dans le tube en verre chaque jour pour éviter le dessèchement des rameaux. Pour les rameaux stressés, le volume d'eau consommé a été mesuré à la fin de l'expérience et a été rapporté à la surface foliaire également calculé à la fin de l'expérience.

Les mesures d'échange gazeux (photosynthèse et conductance stomatique) ont été réalisées tous les jours de 8h à 11h et pendant 7 jours (première journée (24h après l'installation des rameaux dans la solution saline), 2^{ème} jour, 3^{ème} jour et 7^{ème} jour). Des échantillons de feuilles ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Ces échantillons ont été utilisés pour réaliser les essais enzymatiques, pour doser les Cl^- et Na^+ foliaire mais également d'autres micro et macroéléments à la fin de l'expérience (jour 7).

III. Mesures physiologiques

1. Détermination du nombre des feuilles, de la surface foliaire et de la taille des fleurs

Le nombre des feuilles a été déterminé à la fin de la période de stress. La surface foliaire et la taille des fleurs ont été mesurées par Image J (application sur Java de traitement d'image). Pour cela 30 feuilles et fleurs ont été collectées par accession. Les surfaces ont été estimées dans un premier temps en pixel par Image J puis rapportés au pixel de la surface de 1cm². Les données obtenues sont exprimées en cm².

2. Mesure de la consommation d'eau des plantes : perte en eau des pots et potentiel hydrique du sol

Le poids des pots a été mesuré chaque semaine tout au long de l'expérimentation afin d'estimer les pertes en eau (Rodriguez-Gamir et al., 2010). A la fin de l'expérience, après 30

jours de stress, le substrat a été transféré dans des sacs en plastique pour mesurer le potentiel hydrique du sol (MPa) (Dew point Potentiometer (WP4, Decagon, USA))

3. Mesure de la pression osmotique des feuilles

La pression osmotique des feuilles a été déterminée selon deux méthodes :

- Pour les rameaux de mandariniers, la pression osmotique a été mesurée selon le protocole de Martre et al. (2002). L'osmolalité du liquide a été mesurée à l'aide d'un osmomètre à pression de vapeur (5500 Vapro, Wescor, Logan, UT). Le calcul de la pression osmotique (Méga pascals) a été fait en se basant sur la relation de Van't Hoff.
- Pour les plants de mandariniers francs de pied, la mesure de la pression osmotique a été réalisée selon le protocole de Callister et al. (2006). Cinq feuilles ont été récoltées toutes les deux semaines. Les feuilles ont été pesées, séchées et broyées. 20 mg de poudre de feuilles séchées ont été pesées auxquelles a été ajouté 1 ml d'eau désionisée. Le matériel a été ensuite transféré dans un bain-marie pendant 1h à 90°C puis centrifugé à 17 000 g pendant 3 minutes. Les mesure de d'osmolalité (n/V) ont ensuite été réalisées à l'aide d'un osmomètre à pression de vapeur (modèle 5500, Wescor, Logan, UT). La pression osmotique foliaire a été estimée au moyen de la formule suivante :

$$\pi = - (n/V) RT / [(m/V) (FW - DW)/DW]$$

Où π est le potentiel osmotique moyen des feuilles (mPa)

(n/V) est l'osmolalité mesurée par l'osmomètre (mOsm·Kg⁻¹)

R est la constante des gaz parfaits (8,314 472 x 10⁻⁶ m³·mPa·K⁻¹·mol⁻¹)

T est la température en Kelvin (293 K)

(m/V) est le ratio de la masse sèche moyenne des feuilles par rapport au volume d'eau de l'extraction

DW est la masse sèche moyenne des feuilles (g), FW est la masse fraîche moyenne des feuilles d'une branche (g)

4. Mesure de la photosynthèse, de la conductance stomatique, de l'efficacité intrinsèque de l'utilisation de l'eau, de la fluorescence du PSII et de la teneur en azote

Les mesures de conductance stomatique (g_s) sur Poncirus ont été réalisées à l'aide d'un poromètre (SC-1, Decagon, USA) (Feuilles de petites tailles). Pour l'ensemble des mandariniers, les mesures des taux de photosynthèse nette (A), et de conductance stomatique

(g_s) ont été réalisées à l'aide d'un système infrarouge d'analyse de gaz (IRGA) (ADC LCpro, Royaume-Uni) et sous un rayonnement photosynthétique actif de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. L'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (WUE_i) a été déterminée en calculant le rapport entre la photosynthèse et la conductance stomatique à une date donnée. Le rendement quantique du transport d'électrons du photosystème II (F_m / F_v), qui représente l'activité du photosystème II, a été mesuré une fois par semaine en utilisant un fluorimètre (Fluorpen FP 100, Photos Instrument System) (Percival, 2005). La teneur en azote total a été déterminée à l'aide d'un azote Pen (N Pen-N 100). Les mesures ont été effectuées le matin (8 h à 11 h) pour éviter une température extérieure élevée sur 3 feuilles présentant un même stade de développement situées dans la partie médiane de la plante.

5. Mesure de la surface et de la densité des stomates

Trois feuilles fraîches ont été récoltées pour chaque génotype et placées dans une boîte humide. Un fragment de feuille (0,5 cm x 0,5 cm) a été collé sur une lamelle sur sa face inférieure. Après élimination de la face supérieure de la feuille (par grattage), les différentes coupes ont été visualisées au microscope, puis photographiées. Le nombre de stomates a été estimé pour chaque coupe et ramené à la surface de la photo prise. La densité des stomates est exprimée en nombre de stomates par mm^2 . La surface des stomates a également été mesurée et exprimée en μm^2 (Morillon 2013, communication personnelle).

6. Mesure de la hauteur des plants

La hauteur des plantes a été mesurée toutes les trois semaines. A la fin de l'expérience, le poids des racines et de la tige ont été déterminés.

IV. Mesures biochimique

1. Identification des plants tétraploïdes et des plants zygotiques

La ploïdie des plants a été déterminé par cytométrie en flux en utilisant des échantillons de feuilles tel que décrit par Froelicher et al. (2007). Pour l'identification des semis zygotiques, l'ADN a été extrait des feuilles, comme décrit précédemment par Doyle et Doyle (1987), et adapté aux agrumes (Cabasson et al., 2001). Les échantillons d'ADN ont été extraits de feuilles et ont été amplifiés par PCR en utilisant la même Single Sequence Repeat établie par Hussain (2012), qui démontrent l'hétérozygotie chez les *Poncirus*. Les produits de la PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant vertical dans du

tampon TBE 0,5 X (Tris 10 mM, acide borique 45 mM et EDTA 0,5 M [pH 8]). Les produits de PCR ont été visualisés par coloration à l'argent, comme décrit précédemment (Beidler et al., 1982).

2. Détermination de la concentration de la proline foliaire

0,5 g de feuilles fraîches ont été homogénéisées avec 10 ml de 3% d'acide sulfosalicylique. Le broyat est ensuite filtré à travers un papier filtre Whatman. 2 ml de filtrat a été mis à réagir avec 2 ml d'acide ninhydrine et 2 ml d'acide acétique glacial pendant 1 heure à 100° C, avant de placer les échantillons dans de la glace. Le mélange réactionnel a été extrait avec 4 ml de toluène. Le contenu a ensuite été mélangé vigoureusement pendant 15-20 secondes. Le chromophore contenant du toluène a été aspiré par la suite à partir de la phase aqueuse, et réchauffé à température ambiante. L'absorbance est lue à 520 nm en considérant le toluène comme témoin. La concentration en proline a été déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée dans les mêmes conditions. Cinq répétitions ont été considérées pour chaque géotypes Les teneurs mesurées ont été rapportées au poids frais de l'échantillon (Bates et al., 1973).

3. Mesure de la teneur en chlorures foliaire et racinaire

Des échantillons de feuilles ont été prélevés pour estimer la teneur en foliaire chlorure. Pour les chlorures racinaires, l'échantillonnage a été effectué à la fin de la période de stress. Pour les teneurs foliaires, cinq feuilles ont été recueillies toutes les trois semaines et séchées pendant 24h à 80°C. Pour les racines, trois échantillons de racines ont été prélevés, nettoyés et séchés à 80°C pendant 24 à 48 heures. La teneur en chlorure foliaire et racinaire a été mesurée selon Iglesias et al. (2004) et exprimée en mg par g de poids sec. 100 mg de matériel sec réduit en poudre ont été incubés toute une nuit à température ambiante avec 10 ml de solution d'extraction (acide nitrique à 0,1 mol/l + 10% acide acétique glacial), puis filtrés. La concentration en chlorures a ensuite été déterminée à l'aide d'un chlorimètre (titrage par ions argent). Au moins trois extractions indépendantes ont été réalisées pour chaque échantillon.

4. Mesure de la teneur du sodium foliaire

Cinq feuilles ont été recueillies à la fin de l'expérimentation, séchées pendant 24h à 80°C puis broyées. 100 ml d'acide nitrique à 69,5% ont été ajoutés à 0,5 g de cette matière sèche. Trois répétitions ont été utilisées pour chaque géotype. Le mélange est laissé pendant 24 heures sous hotte à température ambiante. Après passage pendant 10 min à 120° et 30 min

à 170°, 2 ml d'acide perchlorique ont été ajoutés à la solution. Le mélange a été placé ensuite à 220°C jusqu'à l'apparition d'une fumée blanche. Le dosage a été réalisé selon une courbe standard préparée dans les mêmes conditions (Quinones, 2013 (communication personnelle)).

5. Dosage des enzymes antioxydantes

i. *Dosage de la catalase et de la peroxydase*

Le dosage de la CAT et de la POD ont été réalisées à partir de feuilles congelées conservées à -80°C et prélevées à différents moments du stress. Les dosages ont été réalisés selon le protocole de Novillo et al. (2013). 0,5 g de feuilles congelées ont été broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier. Trois répétitions biologiques provenant de trois plants indépendants ont été considérées pour chaque génotype. Pour chaque échantillon, 0,05 de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) et 10 ml de solution d'extraction 0,05 M, pH = 7, composée de 39% de NaH_2PO_4 et 61% de Na_2HPO_4 et contenant 1 mM d'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique), et 2 mM de DTT (dithiothreitol) ont été rajoutés à chaque échantillon. Les contenus ont été homogénéisés par la suite puis centrifugés pendant 25 min à 4°C à 12000 rpm. Les mesures ont été effectuées sur le surnageant à l'aide d'un spectromètre à 240 nm pour la catalase et 470 nm pour la peroxydase.

ii. *Dosage de la superoxyde dimutase*

La détermination de l'activité de la SOD a été réalisée en se basant sur le protocole établi par Novillo et al. (2013) qui permet la réduction des radicaux nitro bleu de tétrazolium (NBT) par les radicaux superoxydes à 560nm. L'unité de SOD a été définie comme étant la quantité d'enzyme qui provoque l'inhibition de 50% de la réaction par rapport à l'échantillon témoin. La SOD total a été extraite à partir de 0,5 g de feuilles congelées et broyées au mortier. 0,05 g de PVPP ont été rajoutés pour chaque échantillon ainsi que 5 ml de solution tampon (0,05 M à pH = 7,8 contenant 8,5% NaH_2PO_4 , 91,5% de Na_2HPO_4 et 1,33 mM DATAPAC). Le surnageant a été filtré et les mesures sont effectuées à 590 nm.

6. Détermination du taux du peroxyde d'hydrogène

En se basant sur le protocole de Novillo et al. (2013), 0,5 g de matériel végétal congelé et broyé a été homogénéisé avec 2,5 ml de TCA puis centrifugé à 4° C pendant 15 min à 12000 rpm. La totalité de la solution a été filtrée. A 0,5 ml du filtrat, 0,5 ml de 10 mM de phosphate de potassium (pH 7.0) et 1 ml d'iodure de potassium ont été rajoutés.

Les mesures de la densité optique sont faites à 390 nm. Le taux de H_2O_2 a été estimé en utilisant une courbe étalon réalisée dans les mêmes conditions.

Résultats et discussion

Chapitre 1

Etude de la diversité au sein du genre Poncirus (*Poncirus trifoliata* Raf.) : Caractérisation moléculaire et évaluation des propriétés de tolérance au déficit hydrique

Résumé :

L'agrumiculture mondiale est dépendante de l'utilisation de porte-greffes qui permet de conférer une meilleure adaptation aux contraintes biotiques et abiotiques. Les *Poncirus* (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) et ses hybrides sont couramment utilisés comme porte-greffes en raison de leur tolérance au virus de la tristeza, au *Phytophthora* mais aussi en raison de leur capacité à améliorer le rendement et la qualité des clémentines dans des conditions de sol acide. Cependant, les *Poncirus* sont connus pour être sensibles à la chlorose ferrique sur sol calcaire et à la salinité. Au sein du genre *Poncirus trifoliata*, il existe de très nombreuses accessions. Toutefois, celles-ci ont été très peu étudiées en ce qui concerne leurs propriétés de tolérance au stress hydrique et salin dans la mesure où très peu des accessions existantes sont couramment utilisées dans les programmes d'amélioration génétique et de création de nouveaux porte-greffes.

Ce chapitre porte donc sur 1) l'analyse de la diversité génétique et phénotypique de 74 accessions appartenant au genre *Poncirus* et 2) sur les propriétés de tolérance au déficit hydrique d'un nombre limité d'accessions représentatives de cette diversité.

La diversité génétique a été étudiée au moyen de 17 marqueurs SSR. Deux groupes génétiques principaux ont pu être mis en évidence. La caractérisation phénotypique a consisté à étudier la taille des graines, la surface foliaire, la taille des fleurs et la production de clémentines (dans le cadre d'un essai porte-greffes). Il a pu être mis en évidence de fortes corrélations entre les caractères morphologiques étudiés et l'appartenance à l'un ou l'autre des groupes génétiques.

A partir des données obtenues concernant la diversité existante au sein du genre *Poncirus*, nous avons sélectionné 10 accessions appartenant aux deux groupes génétiques identifiés. Ces 10 accessions ont été soumises à un déficit hydrique. Les paramètres physiologiques tels la conductance stomatique des feuilles, le rendement quantique du transport des électrons PSII, le potentiel hydrique du sol, la pression osmotique des feuilles et la transpiration ont été mesurés au cours du stress.

Les génotypes appartenant au premier groupe génétique se sont révélés être plus sensibles au déficit hydrique que les génotypes du groupe 2 : le *Poncirus* 'Rubidoux' est apparu comme étant l'une des accessions les plus tolérantes tandis 'Pomeroy' s'est révélé être l'une des accessions les plus sensibles. Notre étude nous a permis de mettre en évidence au sein du genre *Poncirus* une corrélation entre appartenance à un groupe génétique donné et le caractère adaptation au déficit hydrique. Ce travail nous a permis de proposer de nouvelles accessions de *Poncirus* potentiellement intéressantes en tant que parents pour les programmes de sélection variétale de porte-greffes.

Article 1:**Diversity in trifoliate orange taxa (*Poncirus trifoliata* Raf.) shows two main groups that are related to morphological traits and water deficit tolerance**

Jihène Ben Yahmed^{1,3}; Gilles Costantino²; Manuel Talon³; Patrick Ollitrault¹; Raphael Morillon^{1,4}; François Luro²

¹CIRAD, UMR AGAP, IVIA, Ctra. Moncada-Náquera Km 5, 46113 Moncada, Valencia

²INRA, UR GEQA, 20230 San Giuliano, France

³IVIA; Centro de Genómica -, Ctra. Moncada-Náquera Km 5, 46113 Moncada, Valencia, Spain

***Corresponding author:** François Luro. Unité de Recherche 1103 Génétique et Ecophysiologie de la Qualité des Agrumes, Centre Inra de Corse, F-20230 San Giuliano, France.

Number of tables: 3; **Number of Figures:** 7

Number of supporting information: 2 tables, 1 figure

Abstract

Poncirus trifoliata is a citrus taxa very useful for the citrus industry since this rootstock is immune to CTV (*Citrus Tristeza Virus*) and it confers tolerance to cold temperature. Numerous accessions of trifoliate orange do exist but little is known regarding the behaviour variability of accessions when subjected to abiotic constraints. The citrus diversity of 74 *P. trifoliata* accessions was investigated using SSR markers. Two major genetic groups were clearly identified. Seed weight, leaf and flower petal area were investigated and clearly showed a strong correlation between the diversity and the phenotypic traits.

Eight genotypes belonging to both genetic groups, as well as two hybrids between the two groups were selected to investigate their properties of tolerance to water deficit. The stress was applied by withdrawing irrigation for 4 weeks. Physiological parameters such as leaf stomatal conductance, quantum yield of PSII electron transport, soil water potential, leaf osmotic potential and transpiration were estimated. We observed that some accessions such as ‘Rubidoux’ were clearly more tolerant to water deficit than others such as ‘Pomeroy’. Interestingly, accessions that presented the higher soil water potential and that were the less

affected by the stress, belonged to the second group. Conversely, accessions of the first group were the less tolerant ones.

Key words: diversity, rootstock, *Poncirus trifoliata*, water deficit.

Introduction

Scion citrus fruit production and quality is affected by rootstock (Jacquemond et al., 2004; Zekri and Al-Jaleel, 2004). Also, the rootstock may confer tolerance to biotic and abiotic stress (Balal and al., 2012). Trifoliate orange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] and its hybrids are commonly used as rootstocks because of their tolerance to CTV (Garnsey et al., 1987), Phytophthora root rot (Boava and al., 2011), Exocortis and nematode (Hardy, 2004). In Corsica, trifoliate orange has been used, not only for biotic tolerances, but also because of its capacity to improve clementine yield and quality under acidic soil conditions (Jacquemond et al., 2004). However, trifoliate orange cultivars are known to be susceptible to iron chlorosis on calcareous as well as salt stress (Castle 1987). Originating from Asia, they have been grown in China for thousands of years (Swingle, 1967). Trifoliate orange cultivars are deciduous shrubs which probably favored their expansions when confronted to cold conditions in their area of origin (Ziegler and Wolfe, 1975). During hard winter, since no transpiration occurs, they can survive to temperature as low as -30°C. However, when grafted, cultivars are not deciduous anymore and the tolerance to cold is much more limited but the use of trifoliate orange rootstocks remains one of the most effective ways to gain tolerance to cold.

Citrus rootstocks must be polyembryonic in order to be propagated by seeds. The occurrence of zygotic genotypes was previously investigated in a rootstock trial of 24 trifoliate orange accessions (Roose and Traugh, 1988). Isozyme analysis of rootstock bark revealed <4% zygoty and the production of off-type genotype from zygotic embryos was generally lower than nucellar genotypes. In a recent study performed on 288 trees with different trifoliate orange rootstock accessions in a field trial, it was observed using SSR markers that 6.6% of rootstocks were zygotic therefore off-types impacting the yield of clementine production (Hussain et al., 2011).

In the study performed on 48 trifoliate orange accessions for the Citrus Variety Collection at the University of California, Fang et al. (1997) showed using isozymes, RFLPs and ISSRs, the existence of four majors groups. Regarding phenotypes, large-flowered accessions were shown in group 4, while small- flowered accessions were in group 3.

'Flying Dragon' presents curved shoot and thorns with a strong dwarf phenotype. Trifoliate orange were grouped into large flowered ('Pomeroy') and small flowered ('Rubidoux') cultivars (Shannon et al., 1960; Jacquemond et al., 1986a, 1986b; 1986c). When grafted with 'Clementine', rootstock/scion associations with large flowered trifoliate orange were more productive than with small flowered accession except those with tetraploid (4x) clones that presented very large flowers (Jacquemond and Rocca Serra, 1992). Recently, trifoliate orange 4x rootstocks were shown to dramatically change both tree physiology and fruit yield without promoting large changes in fruit quality criteria (Hussain et al., 2012). Also 4x trifoliate orange were shown less sensitive to Excortis than other poncirus cultivars (Vogel and Bove, 1986)

Drought stress may limit growth, reproductive development and ultimately, plant survival. When occurring, drought or water shortage will lead to a progressive stomatal closure, which will decrease physiological parameters such as water transpiration and photosynthesis and will cause a severe reduction in the CO₂ assimilation capacity. The associated decline in leaf cell turgor will lead to a limitation of the diffusion of CO₂ and then to a reduction of the quantum yield of PSII that may induce photorespiration and H₂O₂ production (Chaves et al., 2009). When confronted to drought stress, plants cope with Reactive Oxygen Species (ROS) accumulation by promoting antioxidant enzymes and by accumulation of primary metabolites such as carbohydrates and osmoprotectant aminoacids such as proline, contributing to maintain cell turgor by osmotic adjustment (Arbona et al., 2013). Proline content increase has been reported in response to different abiotic stress conditions, including water deficit (Molinari et al., 2004). When comparing the proline levels in plants with different degrees of stress, higher proline contents are most often associated to the more resistant ones. However, there are also many examples in which there is no positive correlation between proline contents and water deficit or salt-tolerance (Ashraf and Foolad, 2007; Chen et al., 2007). Then, the ability to synthesize and accumulate proline may be then considered as tolerance trait in order to enhance the osmotic adjustment. Nonetheless, it can be considered that an increase of the leaf proline content is also associated to a response to a faster decrease of the water potential of the plant and the substrate where the roots are growing, and may then be considered as a marker of sensibility of the genotype.

In this paper, by using SSRs markers, we characterized the diversity among 74 trifoliate orange accessions of INRA-CIRAD citrus germplasm (Corsica, France). Also, we report the comportment of tolerance of 10 cultivars representative of the identified clusters of diversity for their properties of tolerance to water deficit.

Materials and methods

The study was focused on 74 accessions representing the totality of the trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L.) collection of San Giuliano INRA-CIRAD citrus germplasm (Corse, France) (Table 1). The majority of the accessions were introduced by seeds to INRA-CIRAD collection from 1963 to 1990. After seedling amplification, plantlets screening was performed based on morphological homogeneity in order to select plants from nucellar origin. Three to five trees were then chosen to represent the accession and introduced in the field collection by planting on self-roots. Many of these accessions have been tested as rootstocks associated with clementine (*C. reticulata* x *C. sinensis*) or sweet orange (*C. sinensis* L. Osb.), in local conditions. At the end of these field trials, the rootstock among trees of each accession inducing the best fruit production of the grafted variety, was selected and amplified by grafting on Carrizo citrange. For those selected trifoliate orange accessions, the ‘SG’ speciation was attributed to relate this selection process. Many of the trifoliate orange accessions of this study were introduced from USA.

Diversity analysis

Genetic diversity analysis by SSR marker genotyping

Two out-group genotypes, sweet orange ‘Valencia late’ (*Citrus sinensis* Osbeck.) and a citrandarin (*C. reshni* x *P. trifoliata*) have been added to the 74 trifoliate orange accessions for the genetic diversity analysis. Three leaves of each accession were sampled in triplicate to ensure reproducibility of the genotyping results. Total genomic DNA was extracted from leaves by a simplified Doyle and Doyle method (Doyle and Doyle, 1987), described in Cabasson et al. (2001). DNA amount was evaluated by spectrophotometry (Nano Drop) and the absence of DNA degradation was visualized by agarose gel electrophoresis.

According to their ability to detect a polymorphism among trifoliate oranges, 17 SSR primer pairs were selected among the panel of citrus genomic SSR and EST-SSR markers developed in our laboratory (Froelicher et al., 2008, Luro et al., 2008). The selection was based on their capacity to reveal a polymorphism among trifoliate oranges and of also on their location on the reference citrus genetic map (Ollitrault et al., 2011) with the objective to perform genetic analysis with a relative good representation of citrus genome with at least one marker from each linkage group (Table 2).

To analyze genetic diversity of cytoplasmic genomes, 3 markers amplifying cpDNA mononucleotide microsatellite sequence (ccmp5, ccmp6 and ccmp7) developed by Weising and Gardner (1999) were used.

Amplifications of SSR markers were performed according to Luro et al. (2008) in a thermocycler (PTC 200, MJ Research) using 10ng of DNA, 0.5 μ M of each primer and 0.8 unit of *Taq* polymerase (Goldstar, Eurogentec). The annealing temperature was fixed for all primer pairs at 55°C (this condition was taking account during the primer designing). Separation of alleles was performed on a 6% polyacrylamide sequencing gel containing 7M urea in 0.5X TBE buffer at 60 W for 2h to 3h. Three microliters of PCR product was mixed to an equal volume of loading buffer containing 95% formamide, 0.25% bromophenol blue and 0.25% xylen cyanol, and 10mM of EDTA. This mixture was heated for 5 min at 94°C to denature the DNA before loading. Gels were stained with silver nitrate following the protocol detailed by Chalhoub et al. (1997) for gel electrophoresis analysis and by comparison with the 10bp DNA standard ladder (Invitrogen).

To determine the genetic diversity structure and relationships between accessions, we scored the SSR alleles for each accession by coding the presence (1) and the absence (0). Genetic distance between each citrus genotype was estimated by calculating the Dice dissimilarity index (Dice, 1945) and UPGMA was applied for dendrogram construction. This analysis was performed with the “DARwin” software developed by CIRAD (Perrier et al., 2003).

Ploidy level evaluation

For each accession two leaves (two repetitions) were collected on tree and from each a small piece of leaf (2.5 mm²) was taken with a punch. With a similar piece of leaf from a triploid reference (Tahiti lime), samples were chopped using a razor blade in the presence of 250 μ l of a nuclei isolation solution (High Resolution DNA Kit Type P, solution A; Partec, Münster, Germany). Nuclei were filtered through a 20 μ m nylon filter and stained with 450 μ l of DAPI (40,6-diamine-2-phenylindol) (High Resolution DNA Kit Type P, solution B; Partec) solution. After 5 min incubation, stained samples were run in a Ploidy Analyzer (PA) (Partec) flow cytometer equipped with a HBO 100-W high-pressure mercury bulb and both KG1 and BG38 filter sets. Histograms were analyzed using the dpac v2.0 software (Partec), which determines peak position, coefficient of variation (CV), and the relative ploidy index of the samples.

Morphological diversity: seed size, leaf and flower petal area

For each genotype, fruit were harvested in November and seeds were extracted. Seeds were then dried for 3 days ambient temperature (around 18°C) and RH= 85%. For each genotype, 10 sets of 10 seeds were weighed. To estimate the leaf and flower petal area, 30

leaves and flowers of each accession were collected and scanned. Mean leaf and petal areas and flower diameters were estimated by using Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), and were expressed in cm² and in mm, respectively.

Clementine fruit yield in function of genetic origin of the Poncirus rootstock

In order to clarify whether the genetic origin of a trifoliate orange rootstock may impact on Clementine fruit yield and quality, data for 3 consecutive years (year 10th to 12th) of clementine production (yield per tree, juiciness, acidity and sugar levels) were gathered for accessions with different genetic origins. These data were previously collected and analyzed for rootstock selection (Jacquemond et de Rocca Serra, 1992; Hussain et al., 2011).

Water deficit

Plant Material and growth condition

Among the 74 genotypes, 10 cultivars belonging to the two genetic groups but also 1 hybrid identified by SSR marker genotyping were analyzed for their properties of tolerance to water deficit. Since all the genotypes were polyembryonic, plant materials were propagated by sowing seeds in a neutral substrate (perlite). Seedlings certified by molecular genotyping as clones of the selected accessions, were transplanted 3 months after germination into 3-litre pots in substrate (sand, turf and peat, 1:1:1) in a greenhouse for 9 additional months. Experiments were performed during the summer in a greenhouse under natural photoperiod conditions with a temperature regime of 15–19°C (night) and 24–29°C (day), and a relative humidity between 60% and 85%.

Water deficit application

Pots weights were equilibrated by addition of substrate to 3.5 kg for all pots allowing for each accession to better estimate water consumption along the water deficit. Seedlings were regularly watered at field capacity for two weeks prior to apply the water deficit. Water requirements to maintain control trees at field capacity were estimated. Seven uniform seedlings per genotype were assigned as control and were irrigated twice a week. The water deficit was applied by ceasing watering of seven uniform seedlings per genotype for 60 days. A plastic disc with a slot for the stem was placed above the substrate in the pot in order that water loss occurred only via the transpiration stream.

Plant water consumption

For each seedling, the leaf surface area was estimated. Pot weight was monitored weekly along the stress to estimate pot water loss (Rodriguez-Gamir and al., 2010). At the end of the experiment, after 30 days of stress, the substrate was transferred into plastic bags to measure the soil water potential using a Dew point Potential Meter (WP4, Decagon, USA)

Stomatal conductance, Quantum yield of PSII, leaf greenness

Since the area of the leaves of Poncirus genotypes were too small, we were not able to use a gas exchange analyzer. Leaf stomatal conductance (g_s) was then monitored using a leaf porometer (SC-1, Decagon, USA). The quantum yield of photosystem II electron transport (F_m/F_v), which represents the Photosystem II activity, was checked every day using a leaf fluorometer (Fluorpen FP 100, Photos System Instrument) (Percival, 2005). Each measurement (Greenness, g_s and F_m/F_v) was taken on 3 mature leaves per plant and 7 plants per accession.

Leaf area, leaf stomatal density and area, leaf osmotic potential

At the end of the experiment, the number of leaves per seedling of each accession was counted. Mean leaf area was estimated as previously mentioned. Seedling leaf total area was estimated by multiplying the number of leaves by the mean surface area of each accession. Slides for the analysis of stomatal size and the number of stomata per unit of leaf surface area (stomatal density) were prepared according to Morillon and Chrispeels (2001). Stomata density and size were estimated using three different slide preparations. Five leaves of different seedlings were harvested at the end of the experiment to measure leaf osmotic potential according to Callister et al. (2006).

Leaf proline content

0, 5 g of fresh leaf powder was homogenized in 10ml of 3% aqueous sulfosalicylic acid and the homogenate filtered through Whatman filter paper. 2ml of filtrate was reacted with 2 ml acid ninhydrin and 2 ml of glacial acetic acid in a test tube for 1 hour at 100°C, and the reaction terminated in an ice bath. The reaction mixture was extracted with 4 ml toluene, mixed vigorously with a test tube stirrer for 15-20 seconds. The chromophore containing toluene was aspired from the aqueous phase, warmed to room temperature and the absorbance read at 520 nm using toluene for blank. The proline concentration was determined from a standard curve and calculated on a fresh weight (Bates et al., 1973)

Statistical analyses

Data are expressed as means \pm SE and were analysed with SIGMASTAT (SPSS, Chicago; www.spss.com_software_science). An ANOVA was used to detect differences in physiological and biochemical behaviour between *Poncirus* accessions. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Genetic diversity in Poncirus

All the trifoliate oranges were totally monomorphic with the 3 chloroplastic markers. Nevertheless, 9 EST-SSR markers and 8 SSRg markers were selected from an initial screening of 79 EST-SSR and 48 SSRg pairs of primer. Only 13.4% of the total markers (11.4% for EST-SSR and 16.7% for genomic SSR) were polymorphic (Table 2). Excepted for the linkage group 3, all other linkage groups of the Clementine citrus map (Ollitrault et al., 2012) were represented by the 17 SSR markers.

Without considering the two controls [sweet orange and (mandarin \times trifoliate orange) hybrid], only 7 genotypes were detected (Fig. 1). The diversity of trifoliate orange group was organized around two major molecular profiles, clustering 47 accessions (N° 1 to 47 trifoliate oranges in Table 1) for the group 1 and 22 accessions (N° 48 to 69) for the group 2. All the accessions from each group are not distinguishable with the set of SSR markers. The genetic distance between the two groups is 0.43 while it's 0.74 between sweet orange and group 2 and 0.86 between sweet orange and group 1. Group 2 is more heterozygous than the group 1 with 15 (88.2%) and 11 (64.7%) of heterozygous markers respectively (Table 2).

Five accessions (N° 70 to 74 in Table 1) have specific molecular profiles: Rich 0110414, Kryder8-5 0110109, Towne 0110131, linked to the group 1, and English Dwarf 0110099 and Variant 0110135 linked to group 2. Analyzing allelic composition of these 5 trifoliate oranges, only Variant 0110135 has alleles absent from the 73 remaining accessions: 1 specific allele with MEST123 and 5 commune alleles with sweet orange or with the (*C. reshni* \times *P. trifoliata*) hybrid. This accession is probably a (Citrus \times Poncirus) hybrid but is not a citrange (*P. trifoliata* \times *C. sinensis*). The 4 last accessions have only alleles present in group 1 or group 2. Kryder8-5 0110109 is originated from a self-crossing or a crossing between two accessions from group 1 because at locus mCrCIR07E12 it is homozygous with a specific allele of group 1 (124nt/124nt). The 3 other accessions are intergroup hybrids (group 1 \times group 2) demonstrated by the presence of specific alleles from both groups at several loci. For

example, English Dwarf 0110099 and Towne 0110131 are composed by two alleles 244nt/242nt at locus MEST110 which are specific of groups 1 and 2, respectively (Table 2). Like the 4 pure trifoliate orange hybrids (Variant is a *Citrus* × *Poncirus* hybrid) other situations of homonymy were detected for Pomeroy, Rich and Rubidoux. Rich 12-2 and Rich 7-5 are classified in group 1 and Rich 16-6 and Rich 22-2 in group 2. Four accessions of Rubidoux introduced from USA and South-Africa (N° 64-67) are included in group 2, while two accessions (N°35 and 47) introduced from USA but selected in Corsican rootstock trials (SG) are member of genetic group 1. Finally, a unique accession of Pomeroy ICVN-0110278 (N°69) is located in group 2 while 4 others are in group1.

Regarding ploidy level, all trifoliate oranges were diploid except for four accessions which were found tetraploid: Holansis ICVN-0110105 (N°46), Pomeroy ICVN-0110081 (N°47) from group 1, Feuille Longue 0110413 (N°68) and Pomeroy ICVN-0110278 (N°69) from group 2. For two supplementary accessions (Pomeroy ICVN-0110081 and Ferme Blanche SRA-1039), a single tree was identified as tetraploid while the other trees were diploids.

For further analyzes, the classification obtained by the diversity of SSR markers was adopted and therefore four genetic backgrounds were identified in the set of trifoliate orange: 3 for diploid accessions (group 1, group 2 and hybrids) and 1 for tetraploid accessions whatever their genetic profile (group 1 or 2).

Morphological diversity

Genotypes belonging to the genetic groups 1 and 2 were investigated regarding their phenotypic differentiation. Mean seed weight, leaf area, flower petal area and flower diameter were measured (Supplemental Table 1). Genotypes of the group 2 presented bigger and thus heavier seeds than the group 1: for group 1, the seed weight was $0.222 \text{ mg} \pm 0,022$ comparing to group 2, $0.252 \text{ mg} \pm 0,033$. A significant difference was noted for the two groups (Fig. 2A). However, the leaf area did not seem to be much different between genotypes of the two genetic groups except for Flying Dragon ICVN-110101 and Commun ICVN-100935 *Poncirus*. The two doubled diploid (4X) that were investigated in the set of genotypes presented larger leaves and heavier seeds than other genotypes. Regarding flower petal area, genotypes of the second group presented smaller petals and flowers than the one of the first group. Flower petal area of doubled diploid was also larger for the genotype that belonged to the first group.

Impact of genetic origin of trifoliate orange rootstocks on clementine fruit production

Clementine production was investigated for three consecutive years for respectively eight and six genotypes that belonged to the first and second genetic group (Supp. Fig.1). Whatever the year of the harvest, clementine yields were not significantly different when using Poncirus rootstocks of the first and second genetic group.

Water deficit tolerance of a subset of genotypes belonging to the two identified genetic groups.

A subset of 10 genotypes from the first and second genetic group as well as two hybrids was selected and seedlings were grown for further experiments. Prior to subject seedlings for 30 days of water deficit, the number of leaves and the total leaf area of the 10 genotypes were estimated and ranked for the smallest value to the highest (Fig. 3A & B). Jacobsen ICVN-110106 and Rubidoux ICVN-101033 were clearly the genotypes that presented the smallest total leaf area while Pomeroy ICVN-101040, S.E.A.B.ICVN-110086, Pomeroy ICVN-110081 and Feuilles moyennes ICVN-110412 were the genotypes that presented the largest leaf area (Fig. 3A). The stomatal density and area were estimated in order to check whether specific feature may be observed depending of the genetic group (Fig. 3C). Jacobsen ICVN-110106 presented the smallest stomata area while Towne ICVN-110131 presented the largest with quite a small density. Commun ICVN-100935 poncirus presented a much higher density of stomates than other genotypes.

To measure water use of genotypes along the water deficit, pots were weighed weekly. As the pots were covered, water loss occurred only via the transpiration stream and pot weight progressively decreased once water was being withheld.

The most severe symptoms were observed in Pomeroy ICVN-0110081 with strong leaf fall accompanied by rapid leaf drying. The same symptoms were observed in Pomeroy ICVN-101040 and S.E.A.B.ICVN-110086 with less intense leaf fall, while other genotypes, such as Rubidoux ICVN-101033 and Jacobsen ICVN-110106 showed little symptoms with a slight yellowing of the lower leaves.

Pot water loss, stomatal conductance (g_s) and the quantum yield of the PSII were monitored along the experiment (Fig. 4). For clarity purposes, only five genotypes representing the range of water loss, g_s and quantum yield of the PSII values were selected to be plotted on the graphs of Fig. 4A, C and E. The accession choice was made to be representative of both genetic groups regarding the different phenotypic traits. Along the experiment, pot water loss was clearly different depending of the accessions: accessions were

ranked according to the value of the ratio of the pots weight after 30 days of stress compared to the pot weight at the field capacity (Fig. 4B). Rubidoux ICVN-101033 and Towne ICVN-110131 were the lowest and the highest water consuming accessions respectively. Evolutions of g_s in control seedlings were observed due to changes of the greenhouse conditions along the experiment. For stressed accessions, decrease of g_s occurred the first week for Pomeroy ICVN-110081 and Pomeroy ICVN-101040 while for Jacobsen ICVN-110106, Flying Dragon ICVN-110101 and Rubidoux ICVN-101033, g_s remained high during the three first weeks (Fig. 4C). At the end of the experiment these accessions presented still fairly high g_s values as represented on figure 4D where genotypes were ranked according to the value of the ratio of the leaf g_s value after 30 days of stress compared to the leaf g_s in control conditions. Using the same kind of representation, quantum yield of PSII was also measured (Fig. 4E). Jacobsen ICVN-110106, Towne ICVN-110131, Kryder ICVN-101029 and Rubidoux ICVN-101033 were clearly not affected while a significant decrease of F_m/F_v was noted for Pomeroy ICVN-110081, Commun ICVN-100935, S.E.A.B.ICVN-110086; Pomeroy ICVN-101040 and Feuilles moyennes ICVN-110412 (Fig. 4F).

The soil water potential, leaf osmotic potential and leaf proline content were measured at the end of the stress. Rubidoux ICVN-101033 and Jacobsen ICVN-110106 were the accessions that presented the highest soil water potential while S.E.A.B.ICVN-110086 and Pomeroy ICVN-110081 presented soil water potential values that were almost ten times lower (Fig 6). Regarding the leaf osmotic potential and the leaf proline contents, Kryder ICVN-101029; Rubidoux ICVN-101033; Jacobsen ICVN-110106 ; Pomeroy ICVN-110081 and Towne ICVN-110131

Poncirus presented the highest osmotic potential and the lowest proline contents (Fig 6A & B). Conversely, S.E.A.B.ICVN-110086 and Pomeroy ICVN-101040 presented low leaf osmotic potential associated to the high proline contents.

Discussion

Diversity in Poncirus

Diversity of trifoliate orange from the INRA-CIRAD citrus Collection was clustered in two major groups. A few of the accessions are divergent from the majority because they correspond to hybrid genotypes. When using ISSR markers, the diversity of trifoliate orange accessions from UCR/USDA Citrus Variety germplasm was similar, the majority of the accessions being distributed in two clusters, one corresponds to small-flowered varieties and the other one to large-flowered varieties (Fang et al., 1997). A same bipartition structure in

Poncirus trifoliata from University of Cukurova, (Adana, Turkey) was observed by Uzun et al. (2011). The low diversity of *Poncirus trifoliata* relatively to low polymorphism (13.4% of polymorphic markers, many accessions with the same molecular profile) supports the idea that genetic base of this group is relatively narrow. This ascertainment is in agreement with other studies made with RAPD (Schafer et al., 2004), AFLP (Pang et al., 2007), SSR markers (Aka-Kacar et al., 2009), SRAPs (Uzun et al., 2009) or isozymes (Novelli et al., 2000). Mutation was certainly the major mechanism of the diversification of *Poncirus trifoliata* and hybridization was largely restricted to intra specific combinations. We have identified five hybrids, four were generated by spontaneous intra-specific crosses and only one presented natural intergeneric hybrid origin. In many countries, blossom period of *P. trifoliata* is shifted relatively to *Citrus* species (it flowers about one month earlier than *Citrus* in Mediterranean area) and therefore natural hybridizations between *P. trifoliata* and *Citrus* rarely occur. Trifoliate oranges produce polyembryonic seeds containing both sexual and apomictic embryos. Seedlings from open-pollinated trifoliate orange seeds develop in a great majority (70-98%) from nucellar (apomictic) embryos that are genetically identical to their mother tree in all characters (Khan and Roose, 1988; Moore and Castle, 1988; Anderson et al., 1991). Developmental competition between the zygotic and nucellar embryos as well as the genotype of the zygote, will affect maturation (Kepiro and Roose, 2007). Nucellar embryony is considered as a barrier for the citrus evolution by sexual reproduction, but depends to the number of somatic embryo per seed (Moore and Castle, 1988). In trifoliate orange, the degree of polyembryony is low (around 2) increasing chance for the germination of plantlets derived from zygotic embryos.

Ploidy variation is also another source of diversification in *Poncirus trifoliata*. Because the propagation of these trees was mainly made by polyembryonnic seedlings, chromosome doubling occurring in nucellar embryos can affect the conformity of regenerated plants introduced in germplasm collection. The frequency of occurrence of chromosome doubling depends to species and environmental conditions and increases in cold areas (Aleza et al., 2011). The proportion of doubled diploid seedlings of *Poncirus trifoliata* varies between 3 to 10% in Corsican conditions. Although the chromosome doubling causes readily observable morphological changes in size, color and thickness of the leaves or on the growth vigor (Allario and al., 2011), several trees or rootstocks with off-type ploidy level can be inadvertently found in collections or agronomic trials. Hussain et al. (2011) detected around 3% of tetraploid trifoliate orange rootstocks in a trial that have not been detected in nursery before the grafting process.

The system dividing the trifoliate into small and large-flowered varieties is accepted by many countries (Shannon et al., 1960; Krueger and Navarro, 2007). It may be tempting to characterize the two trifoliate groups (small- and large-flowered varieties). Large-flowered varieties had an up-right habit of growth with a single trunk whereas small-flowered varieties produced multiple trunks resulting in a bushy growth habit Shannon et al. (1960). Fruits from small-flowered varieties matured earlier than those from large-flowered varieties. Japan has a somewhat different system (Tanaka, 1969) where four different strains are recognized based upon leaf size: diploid large, medium and small leaf and tetraploid large leaf. Our study demonstrates that flower size is more variable than leaf size and also more discriminant for the classification of trifoliate orange accessions into genetic group 1 or 2. Tetraploid genotypes can be easily identified by larger leaf and higher weighted seed. Unfortunately, all these morphological parameters used separately or together are not useful to perform systematically a right classification for all accessions. This relative low diversity of phenotype and the absence of distinctive morphological characters contributed to false identification and wrong classification of trifoliate orange accessions, represented by detected homonymy in our study. The relative high frequency of homonymy in *P. trifoliata* is also previously reported (Uzun et al., 2011). The only way to classify with certainty each trifoliate orange accession is the genotyping by molecular markers. Because simplicity of genotype performing and accuracy of results, SSR markers were preferred to ISSR. Furthermore, accessibility to heterozygosity due the co-dominance SSR markers is suitable to identify the genetic origin of hybrid genotypes. Nevertheless, to identify each accession ISSR markers are more powerful than co-dominant markers (Fang et al., 1997).

Water deficit tolerance among Poncirus diversity

When grafted, Poncirus is considered as a sensitive rootstock to water deficit (Wu et al., 2007). Conversely, Poncirus seedling of all accessions presented very strong trait of tolerance since most of the plants remained healthy for the first three weeks. Interestingly, tolerant rootstock such ‘Rangpur’ lime (*C. limonia*) are known to be very tolerant to drought (Froelicher et al., 2011; Ollittraut et al., 2012), while the seedlings are much more sensitive. This suggests that criteria such as leaf canopy surface area, root to shoot interaction or the capacity of the root to deeply growth in the soil, may strongly affect the properties of tolerance to water deficit of a tree. Among Poncirus accessions, ‘Flying Dragon’ is probably the accession with the largest phenotypic differentiation when compared to the other ones. This is a slow growing accession cognizable by highly twisted, contorted stems and by large

thorns on the shoots. In the field, in non-irrigated condition, non-irrigated grafted ‘Flying Dragon’ showed to be high yield efficient due to small canopy (Espinoza-Nunez et al., 2009). Then, this rootstock is considered to be very suitable for high density plantation (Stuci et al, 2003; Cantuarias-Avilés et al., 2010). In our experiments, ‘Flying Dragon ICVN-110101’ seedlings presented limited number of leaves and was ranked as medium for the leaf total area. Except ‘Rubidoux ICVN-101033’ and ‘Jacobsen ICVN-110106’, all the accession presented a soil water potential bellow 1 MPa (Fig. 5) and even lower for ‘Pomeroy ICVN-110081’ suggesting that at least for that accession the soil water potential felt bellow the permanent wilting point. As expected, the two accessions that presented the strongest symptoms of stress which associated leaf fall and leaf yellowing were ‘Pomeroy ICVN-101040’ and ‘Pomeroy ICVN-110081’ (Table 3) that belonged to the genetic group 1. Conversely, ‘Rubidoux ICVN-101033’, ‘Jacobsen ICVN-110106’ and ‘Feuilles moyennes ICVN-110412’ that belonged to the genetic group 2 presented the less severe symptoms and the highest water potential (Fig. 5). Measurements of leaf osmotic potential and proline content were in agreement with these observations: accessions that were subjected to the lower soil water potential were the ones with the lower leaf osmotic potential and the highest proline synthesis. Interestingly, ‘Flying Dragon ICVN-110101’ presented one of the highest level of leaf proline content, intermediate symptoms (Table 3) with a quite high soil water potential suggesting that this accession had a greater osmotic adjustment than other accessions to maintain leaf cell turgor (Molinari et al., 2004 ; Arbona et al., 2013). Except in ‘Feuilles moyennes ICVN-110412’, we may suspect that proline synthesis was mostly associated to response of the plant to a faster decrease of the water potential, and may be considered as marker of sensibility. In our experiments, accessions that were the most tolerant were the ones with the smallest leaf total area such as ‘Jacobsen ICVN-110106’ and ‘Rubidoux ICVN-101033’ (Fig. 3B). ‘Feuilles moyennes ICVN-110412’ presented the largest leaf area that was associated to high stomatal density and large stomata size (Frig. 4C) and the lowest soil water potential, however, this accession was not the most affected (Table 3). The leaf osmotic potential of ‘Feuilles moyennes ICVN-110412’ and ‘S.E.A.B.ICVN-110086’ were the lowest among all accessions (Fig. 6A) even though proline synthesis was middle ranked (Fig. 6B). This suggests that other compounds such as glycine betain may enhance the osmotic adjustment (Ashraf and Foolad, 2007) which may have favored their adaption to water deficit. Stomata allow plants to regulate transpirational water loss from leaves during the simultaneous uptake of CO₂ for photosynthesis. Accessions with small stomata and low stomatal density are expected to present enhanced plant fitness in a broader range of

environments (Franks and Beerling, 2009). ‘Kryder ICVN-101029’ and ‘S.E.A.B.ICVN-110086’ presented the smallest density and size of stomata. Interestingly, ‘S.E.A.B.ICVN-110086’ has shown to be most tolerant than ‘Kryder ICVN-101029’ even though ‘S.E.A.B.ICVN-110086’ presented largest total leaf area and then largest possibilities of water transpiration. However, it is important to note that these two accessions presented at the end of the stress the most contrasted leaf osmotic potential even though the water potentials were low and quite similar, which then may explain the difference of trait tolerance.

In the citrus industry, just a few *Poncirus* accessions such ‘Rubidoux ICVN-101033’, ‘Flying Dragon ICVN-110101’ or ‘Pomeroy ICVN-101040’ are used as rootstock (Rocca Serra et Ollitrault, 1992; Espinosa-Nunez et al., 2011; Schinor et al., 2013) or in breeding programs in association with other citrus such as ‘Cleopatra’ (*C. reshni*) or ‘Sunki’ (*C. sunki*) mandarins to confer CTV tolerance (Rocca Serra et Ollitrault, 1992). When grafted, *Poncirus* genus is not known to confer great traits of tolerance to water deficit. However, at the end of the water deficit we performed, accessions that belonged to the genetic group 2 of *Poncirus* presented the highest soil water potential suggesting that this group was experiencing the lower stress at root level and were gathering the most tolerant *Poncirus* accessions. Then, it would be required to compare the water deficit tolerance of accessions of the group 1 and 2 grafted with a variety. .

Acknowledgments

Jihene ben Yahmed was supported by a scholarship for doctorate degree from the Government of Tunisia, Ministry of higher education and scientific research of Tunisia.

References

- Allario** T. ; Brumos J. ; Colmenero-Flores J.M. ; Tadeo F. ; Froelicher Y. ; Talon M. ; Navarro L. ; Ollitrault P. ; Morillon R. ; 2011 : Large changes in anatomy and physiology between Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *Journal of Experimental Botany*: 62(8):2507-19
- Aleza**, P., Froelicher, Y., Schwarz, S., Agust, M., Hernandez, M., Juarez, J., Luro, F., Morillon, R., Navarro, L. and Ollitrault, P., 2011. Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Annals of Botany*:1-14.

- Aka-Kacar** Y., Yesiloglu T., Yildirim B., Simsek O., Incesu M., Kamiloglu M., and Tuzcu O., 2009. Genetic characterization of some citrus rootstock by using SSR markers. *Alatarim*, 8, 8-16.
- Anderson** C.M., Castle W.S. and Moore G.A., 1991. Isozymic identification of zygotic seedlings in Swingle citrumelo *C. paradisi* x *P. trifoliata* nursery and field populations. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 116, 322-326.
- Ashraf** M, Foolad MR. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 59:206-16.
- Ashari**, S., Aspinall, D., Sedgley, M., 1988. Discrimination of zygotic and nucellar seedlings of 5 polyembryonic citrus rootstocks by isozyme analysis and seedling morphology. *J. Hort. Sci.* 63, 695-703.
- Balal** R.M., Khan M.M, Shahid M.A., Mattson N.S , Abbas T., Ashfaq M., Garcia-Sanchez F., Ghazanfer U., Gimeno V., Iqbal Z. 2012. Comparative studies on the physiobiochemical, enzymatic and ionic modifications on salt tolerant and salt sensitive *citrus* rootstocks under NaCl stress. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 137(2):86–95.
- Bar-Joseph**, M., Lee, R. 1989. Citrus tristeza virus. *CMI/AAB Descriptions of plant viruses*: 353 (7).
- Barrett**, H.C., Hutchinson, D.J., 1982. Occurrence of spontaneous octoploidy in apomictic seedlings of a tetraploid Citrus hybrid, *Proc. Int. Soc. Citriculture*, pp. 29-30.
- Barrett**, H.C., Hutchison, D.J., 1978. Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of Citrus. *Econ. Bot.* 32, 27-45.
- Beidler**, J., Hilliard, P., Rill, R., 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Analyt. Biochem.* 126, 374-380.
- Boava** L.P, Cristofani-Yaly M., Mafra V.S, Kubo K., Kishi L.T, Takita M.A, Ribeiro-Alves M., Machado M.A. 2011. Global gene expression of *Poncirus trifoliata* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*). *BMC Genomics* : 12-39
- Cabasson**, C.M., Luro, F., Ollitrault, P., Grosser, J.W., 2001. Non-random inheritance of mitochondrial genomes in Citrus hybrids produced by protoplast fusion. *Plant Cell Rep.* 20, 604-609.
- Cameron**, J., Frost, H., 1968. Genetics, breeding and nucellar embryony. *The citrus industry*. Berkeley: University of California 2, 325-370.
- Cameron**, J.W., Soost, R.K., 1968. Characters of new populations of Citrus polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny, 1st Int. Citrus Symp., pp. 199-205.

- Chaves**, M. M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 2009, 103, 551–60.
- Dice**, L., 1945. Measure of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26, 297-302.
- Chen** Z, Cuin TA, Zhou M, et al. 2007. Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance *J Exp Bot.* 58: 4245-255
- Doyle**, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
- Economides**, C., Gregoriou, C., 1993. Growth, yield, and fruit quality of nucellar frost'Marsh'grapefruit on fifteen rootstocks in Cyprus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118, 326-329.
- Espinoza-Núñez**, E., Filho, F. de A. A.M., Stuchi, E.S., Cantuarias-Avilés, T., Dias, C.T. dos S. (2011) Performance 'Tahiti' lime on twelve rootstocks under irrigated and non-irrigated conditions. *Scientia Horticulturae*, n.129, p. 227 – 231
- Fallahi**, E., Rodney, D., 1992. Tree size, yield, fruit quality, and leaf mineral nutrient concentration of 'Fairchild' mandarin on six rootstocks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117(1), 28-31.
- Franks**, P.J. and Beerling D. J. 2009. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 10343-7
- Froelicher**, Y., Bassene, J.B., Jedidi-Neji, E., Dambier, D., Morillon, R., Bernardini, G., Costantino, G., Ollitrault, P., 2007. Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Rep.* 26, 937-944.
- Froelicher**, Y., Dambier, D., Costantino, G., Lotfy, S., Didout, C., Beaumont, V., Brottier, P., Risterucci, A.M., Luro, F., Ollitrault, P., 2008. Characterization of microsatellite markers in *Citrus reticulata* Blanco. *Mol. Ecol. Res.* 8, 119–122.
- Froelicher** Y., Mouhaya W., Bassene J.B., Costantino G., Kamiri M., Luro F., Morillon R., Ollitrault P. 2011. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genet Gen.* 7: 49-61.
- Garnsey**, S., Barrett, H., Hutchison, D., 1987. Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica* 19, 187-191.
- Hardy** S. 2004. Growing lemons in Australia- a production manual. Department of Primary Industries. New South Wales, Australia. Available on:
[<http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/horticulture/citrus/lemon-manual>]

- Hussain, S.**, Curk, F., Ollitrault, P., Morillon, R., Luro, F., 2011. Facultative apomixes and chromosome doubling are sources of heterogeneity in citrus rootstock trials: impact on clementine production and breeding selection. *Sci. Hortic.* 130, 815–819.
- Jacquemond, C.**, Rocca Serra, D., 1992. Citrus rootstocks selection in Corsica for 25 years. In: *Proc. Soc. Citriculture*, pp. 246–251.
- Jacquemond, C.**, Tison, G., Agostini, D., Navari, C., Roesch, M., Vittori, D., 2004. C32 and C35 citrange: possible new rootstocks for Clementine in Corsica, *Proc. Int. Soc. Citriculture*, pp. 321–322.
- Kepiro J.L.** and Roose M.L., 2007. Nucellar Embryony *In* Khan I. (ed.): *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI publishing, Londres, 141–149.
- Khan, I.**, Roose, M., 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliate orange. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113, 105–110.
- Krueger R.R.** and Navarro L., 2007. Citrus germplasm Resources *In* Khan I. (ed.): *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI publishing, Londres, 45–140.
- Louzada, E.S.**, del Rio, H.S., Setamou, M., Watson, J.W., Swietlik, D.M., 2008. Evaluation of citrus rootstocks for the high pH, calcareous soils of South Texas. *Euphytica* 164, 13–18.
- Luro, F.**, Costantino, G., Argout, X., Froelicher, Y., Terol, J., Talon, M., Wincker, P., Ollitrault, P., Morillon, R., 2008. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and 751 their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics* 9, 287–304.
- Mestre, P.F.**, Asins, M.J., Carbonell, E.A., Navarro, L., 1997. New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. To citrus tristeza virus. *Theor. Appl. Gen.* 95, 691–695.
- Molinari, H. B. C.**; Marur, C. J.; Filho, J. C. B.; Kobayashi, A. K.; Pileggi, M.; Júnior, R. P. L.; Pereira, L. F. P.; Vieira, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Sci.* 2004, 167, 1375–1381.
- Moore, G.A.**, Castle, W.S., 1988. Morphological and isozymic analysis of open-pollinated citrus rootstocks populations. *J. Hered.* 79, 59–63.
- Novelli, V.M.**; Machado, M.A. & Lopes, C.R., 2000. Isoenzymatic polymorphism in *Citrus* spp. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (Rutaceae). *Genet. Mol. Biol.* 23: 1163–1168.
- Ollitrault, P.**, Jacquemond, C., 1994. Facultative apomixis, spontaneous polyploidization and inbreeding in *Citrus volkameriana* seedlings. *Fruits* 49, 479–480.

- Ollitrault** P, Navarro L. 2012. Citrus. In: M Badenes, D Byrne, eds. Fruit Breeding. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 623-662.
- Pang** X.M., Hu C.G., Deng X.X., 2007. Phylogenetic relationship within *Citrus* and related genera as inferred from AFLP markers. Genetic Res. Crop Evol. 54, 429–436
- Perrier**, X., Flori, A., Bonnot, F., 2003. Methods for data analysis. In: Hamon, Seguin, Perrier, Glaszmann (Eds.), Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants. Science publishers, Montpellier, pp. 21–63.
- Roose**, M.L., Kupper, R.S., 1992. Causes and Consequences of variability in rootstocks, Proc. 1st Int. Sem. Citriculture in Pakistan, pp. 122-130.
- Roose**, M.L., Traugh, S.N., 1988. Identification and performance of citrus trees on nucellar and zygotic rootstocks. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113, 100-105.
- Saleh**, B., Allario, T., Dambier, D., Ollitrault, P., Morillon, R., 2008. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. C. R. Biol. 331, 703-710.
- Schafer** G., Bastinel M., Dornelles A.L.C., 2004. Genetic diversity of citrus rootstocks based on RAPD marker analysis. Ciência Rural, 34, 1437-1442.
- Schinor** H.E, Yaly M.C, BastianelM. and Machado M.A. 2013. Sunki Mandarin vs Poncirus trifoliata Hybrids as Rootstocks for Pera Sweet Orange. Journal of Agricultural Science; Vol. 5, No. 6:190-200.
- Shannon**, L.M., Frolich E.F. and Cameron S.H., 1960. Characteristics of *Poncirus trifoliata* selections. Proceedings of the American Society for Horticultural Society 76, 163-169.
- Soost**, R., Cameron, J., Janick, J., Moore, J., 1975. Advances in fruit breeding. Purdue University Press.
- Syvertsen**, J.P., Lee, L.S., Grosser, J.W., 2000. Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO₂. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125, 228-234.
- Tutberidze**, B.D., Kalandarishvili, T.L., 1975. The results of studies on the qualities of Poncirus trifoliata "Tetraploid No. 1" as a rootstock for citrus crops. Subtrop. Kul'tury, 74-79.
- Uzun** A., Gulsen O., Seday U., Yesiloglu T., Aka-Kacar Y., Tuzcu O., 2011. Investigation of genetic relationships among trifoliata oranges and their hybrid relatives based on ISSR markers. Romanian Biotechnological Letters Vol. 16, No. 4, 6430-6438.
- Uzun** A., Yesiloglu T., Aka-Kacar Y., Tuzcu O., Gulsen O., 2009. Genetic diversity and relationships within Citrus and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs) Scientia Horticulturae 121, 306–312.

- Wheaton**, T., Castle, W., Whitney, J., Tucker, D., 1991. Performance of citrus scion cultivars and rootstocks in a high-density planting. *HortSci.* 26, 837-840.
- Xiang**, C., Roose, M.L., 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in 12 citrus rootstocks. *Sci. Hortic.* 37, 47-59.
- Zekri**, M., 1996. Leaf mineral concentration, growth, yield, fruit quality, and economics of 'Ambersweet' orange on two rootstocks, *Proc. Florida St. Hort.Soc.*, pp. 92-96.
- Zekri**, M., Al-Jaleel, A., 2004. Evaluation of rootstocks for Valencia and Navel orange trees in Saudi Arabia. *Fruits* 59, 91-100.
- Wu** Q.S., Xia R.X, Zou Y.N. et Wang G.Y. 2007. Osmotic solute responses of mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings to drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum.* 29.6: pp 543-549

Table 1: Name, origin and identification numbering of trifoliate orange (*P. trifoliata*)

N°	Name of variety	Id Number	Origin	N°	Name of variety	Id Number	Origin
1	Algeria	ICVN-0110277	Algeria	38	Rusk	SRA-1037	USA SG
2	Argentine	SRA-1009		39	S.E.A.B.	SRA-1032	Algeria SG
3	Argentine	ICVN-0110079	Argentina SG	40	S.E.A.B.	ICVN-0110086	Algeria SG
4	Argentine	ICVN-0110275	Argentina SG	41	S.E.A.B.	ICVN-0110471	Algeria SG
5	Argentine	ICVN-0110276	Argentina SG	42	USDA	ICVN-0110415	USA
6	Benecke	SRA-1021	USA SG	43	Webber Fawcett	ICVN-0110136	USA
7	Benecke	SRA-1028		44	Yamagushi	SRA-1024	USA
8	Benecke	ICVN-0110083	USA SG	45	Yamagushi	ICVN-0110138	USA
9	Benecke	ICVN-0110089	USA	46	Commun	ICVN-0110133	Japan
10	Beneke	SRA-1008		47	Commun	SRA-935	
11	Brazil	ICVN-0110091	Brazil	48	English	SRA-1035	RSA
12	Christian	SRA-1023	RSA SG	49	English Dwarf	ICVN-0110098	USA
13	Christian	ICVN-0110085	USA SG	50	Feuille Moyenne	ICVN-0110412	Japan
14	Christian	SRA-1026	USA SG	51	Feuilles Grandes	ICVN-0110134	Japan
15	Christian	ICVN-0110084	Algeria SG	52	Flying Dragon	ICVN-0110104	USA
16	Christiansen	ICVN-0110094	USA	53	Flying Dragon	SRA-1003	
17	Davis	ICVN-0110095	USA	54	Flying Dragon	ICVN-0110101	USA
18	Ferme Blanche	SRA-1027	Algeria SG	55	Flying Dragon	ICVN-0110103	USA
19	Ferme Blanche	SRA-1039	Algeria	56	Jacobsen	ICVN-0110106	USA
20	Kryder	SRA-1022	USA SG	57	Jacobsen	SRA-1031	
21	Kryder	SRA-1029	RSA	58	Pomeroy	ICVN-0110278	France
22	Kryder	ICVN-0110108	USA SG	59	Rich 16-6	ICVN-0110122	USA
23	Grande fleurs	ICVN-0110111	USA	60	Rich 22-2	ICVN-0110123	USA
24	Luisi	ICVN-0110448	France SG	61	Rich 22-2	SRA-1005	
25	Menager	SRA-1030	France SG	62	Rubidoux	ICVN-0110127	USA
26	Menager	SRA-1020	France SG	63	Rubidoux	ICVN-0110128	USA
27	N°4	SRA-936		64	Rubidoux	SRA-1033	RSA SG
28	Pomeroy	SRA-996		65	Rubidoux SG	SRA-997	
29	Pomeroy	SRA-1040	USA SG	66	Towne	ICVN-0110132	USA
30	Pomeroy	ICVN-0110081	USA SG	67	Rich	ICVN-0110414	USA
31	Pomeroy	ICVN-0110119	USA SG	68	Towne	ICVN-0110131	USA
32	Pursha	SRA-1041		69	English Dwarf	ICVN-0110099	USA
33	Rich 12-2	ICVN-0110121	USA	70	Kryder 8-5	ICVN-0110109	USA
34	Rich 7-5	ICVN-0110124	USA	71	Variant	ICVN-0110139	France
35	Rubidoux	SRA-1038	USA SG	72	Rubidoux	SRA-1025	USA SG
36	Rusk	ICVN-0110437	USA SG	73	Holansis	ICVN-0110105	China
37	Rusk	SRA-1034	USA SG	74	Feuille Longue	ICVN-0110413	Japan

¹ICVN : International Citrus Varietal Numbering ; SRA : Station de Recherche Agronomique²SG : San Giuliano (the accession was selected for their performances from rootstock trials made in San Giuliano)

Table 2: Characteristics of the SSR markers used for the analysis of trifoliolate orange diversity and the allelic variation detected between the two genetic groups; bold numbers are sizes of specific alleles of each genetic group.

	Marker name	Poncirus group 1		Poncirus group 2		L G / genetic map	Position on LG* (cM)	Forward Primer Sequence 5'->3'	Reverse Primer Sequence 5'->3'	AT (°C)	Published
		Allele 1 size (NT)	Allele 2 size (NT)	Allele 1 size (NT)	Allele 2 size (NT)						
EST SSR	Mest099	310	--	306	310	--	--	CTCATTTCATGGCTGCTCTCA	ATGATGCTGGTGATTGTGG A	55	new
	MEST110	240	244	240	242	5	11.7	CTGGCTCAGCTCTGCTCATT	ATGACATAATCGTGCCCTG C	55	new
	MEST123	258	264	262	264	9	9.9	GGGATGGACTCCCAGTGTTA	AAGAAAGATTTGCTGGCAG AG	55	Aleza et al. 2011
	MEST370	206	--	206	209	1	59.9	CCACCTCCGATCCAATCTA	ATTGCGAAGATGGCTGAGA T	55	new
	Mest394	210	212	196	212	4	117.1	CAAGATATGCTGGCCCTTGT	AACTCATCAAGCATGGAGG C	55	new
	Mest396	279	281	263	281	--	--	ACAAGATATGCTGGCCCTTG	GATGGCCGCTTAGTCACAT T	55	new
	Mest530	288	292	292	--	3	59.5	GGCGAACGGAAACAATAAA	GATTGTGACTGTGGCTGTG G	55	new
	MEST830	218	226	218	224	7	59.4	TTCATGGCAGCTTGAGTTTC	TTGGTTTCTTTTGGGGATCA GCAAGGCAACAGCTATCCT	55	Luro et al. 2008
	MEST925	174	--	174	194	--	--	CGGAAAAGTAAAGAAACA	C	55	new
Genomic SSR	mCrCIR01E02	164	170	170	176	9	29.8	TGAATGGTACGGGAAATGC	CAGGGTCGGTGGAGAGGAT	55	Froelicher et al. 2008
	mCrCIR07E05	126	128	128	130	8	3.5	GGAGAACAAAACACAATG	ATCTTTCGGACAATCTT	50	Froelicher et al. 2008
	mCrCIR07E12	124	126	126	130	2	22.2	TGTAGTCAAAAGCATCAC	TCTATGATTCCTGACTTTA	50	Froelicher et al. 2008
	Ci01D11	196	201	196	--	9	33.7	GCAAAACAAGCAGACTACAA AT	AGGACAGATGACCCAGATG ACA	55	Froelicher et al. 2008
	Ci01H05	113	--	103	113	--	--	AAAACAACCAAAAGGACAAG ATT	TTCAAACATAACAAACCAA CTCG	55	Froelicher et al. 2008
	mCrCIR05A05	248	--	228	248	5	30.9	ATACCTGTGAGCGTGAG	CCTCTTCCCTTCCATT	50	Cuenca et al. 2011
	mCrCI06A08	128	--	115	128	--	--	TTTTTGTATGGTGTCGTTGT T	TGGTATTATTTTGTTCATTCA TTTG	50	Froelicher et al. 2008
	mCrCIR06B07	104	108	108	110	5	0	CGGAACAACATAAAACAAT	TGGGCTTGTTAGACAGTTA	50	Froelicher et al. 2008

Table 3: Symptoms observed Poncirus accessions after 4 weeks of water deficit

Genotype	ICVN	Genetic group	Intensity of stress	Symptoms
Pomeroy	110081	1	****	Intense winding and drying leaf, falling leaves
S.E.A.B	110086	1	***	Intense drying of apical leaves, high leaf curl
Kryder	101029	1	*	Wilted leaves
Pomeroy	101040	1	***	Highly wilted leaves, apical leaf fall
Towne	110131	1x2	*	Yellowing of the leaf tips on the base, slightly wilted leaves
Flying Dragon	110101	2	**	Intense yellowing of the leaf tip accompanied by dryness and a foliar winding, leaf yellowing
Commun	100935	2	*	Highly wilted leaves
Feuilles moyennes	110412	2	**	Yellowing of leaves of the basal parts of plants and intense winding of apical leaves
Rubidoux	101033	2		No visible symptoms
Jacobsen	110106	2	*	Slight yellowing and drying of leaf tips only for the basal leaves

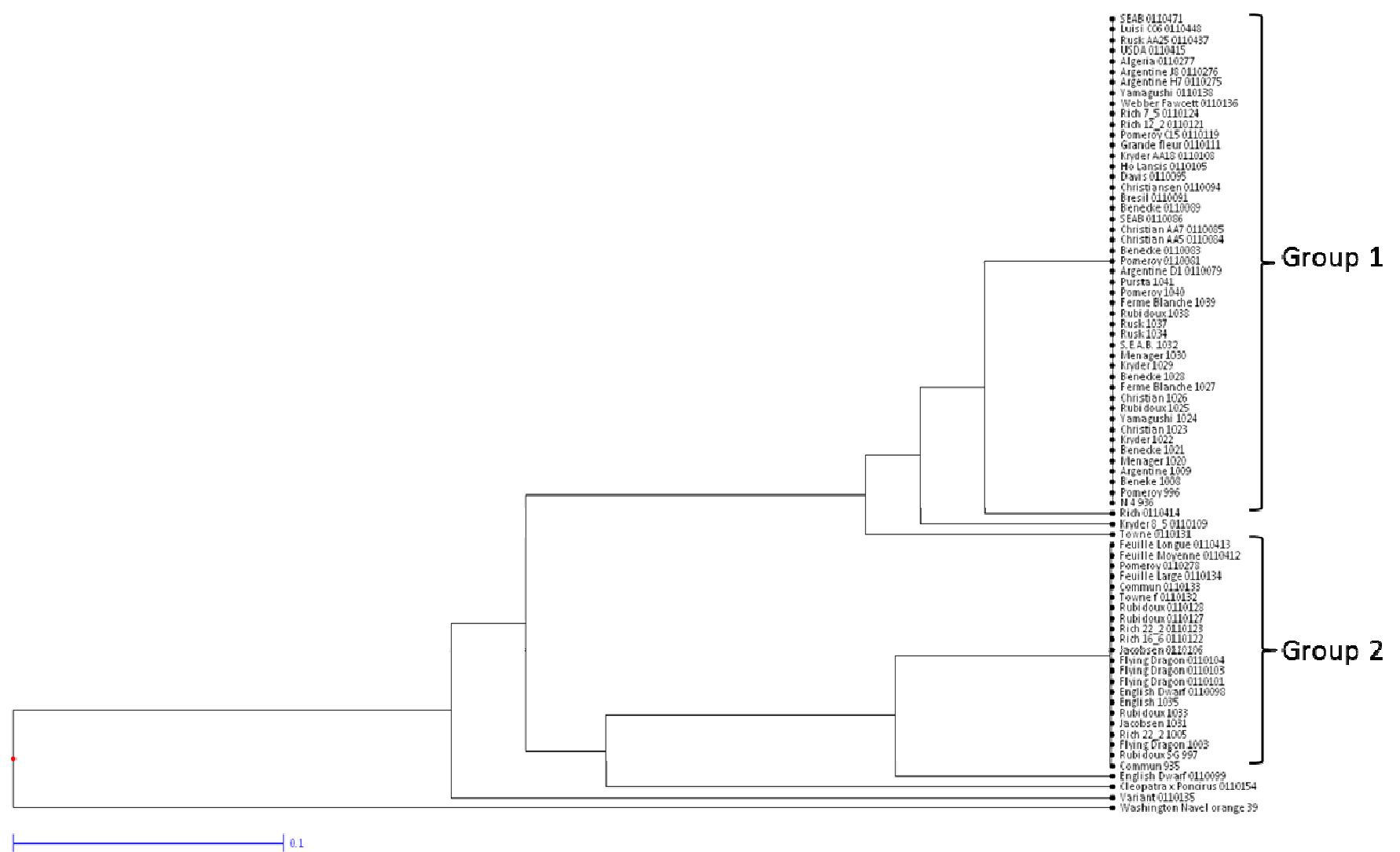


Fig.1: Dendrogram representing the diversity structure and polymorphism of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L.) accessions of INRA-CIRAD citrus germplasm, based on SSR marker data and UPGMA clustering method. Whashington Navel orange and the hybrid (Cleopatra mandarin x Rubidoux trifoliate orange) ICVN-0110154 are used as out-group references

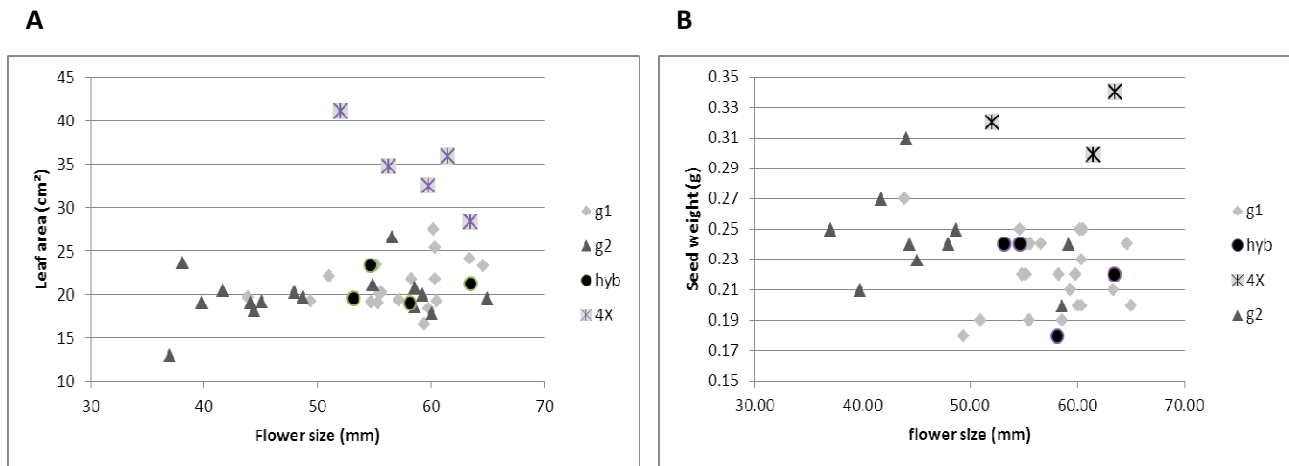


Fig. 2: Phenotypic differentiation of genetic groups of trifoliate orange depending on seed weight, leaf area and flower size. Diversity of trifoliate oranges based on flower size and leaf area (A) and on seed weight and flower size (B). Each symbol represents a different kind of genetic clustering where 'g1' and 'g2' are respectively the genetic groups 1 and 2, 'hyb' the intergroup hybrids and '4x', the tetraploid genotypes, detected by molecular markers analysis.

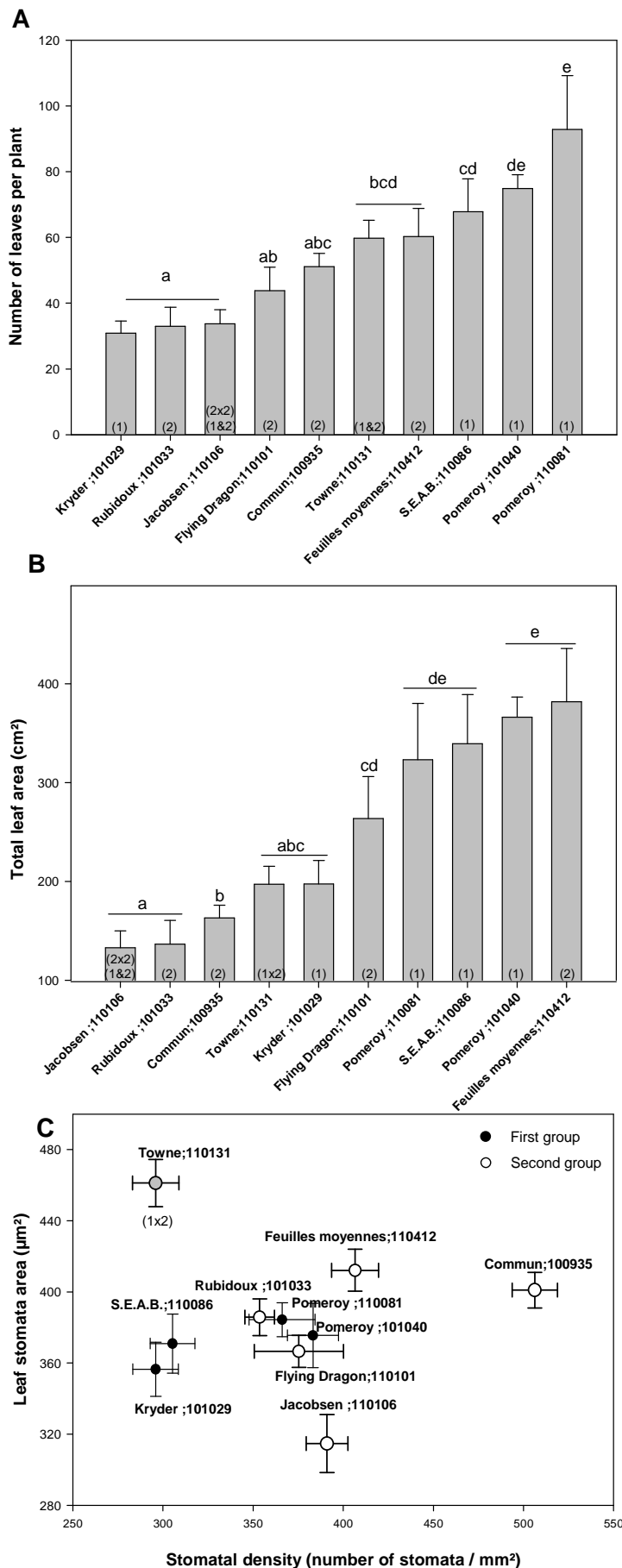


Fig. 3: Phenotypic differentiation for number of leaves, leaf area, number of stomata and stomatal density depending of trifoliate orange accessions. A) Mean number of leaves calculated for the 10 Poncirus accessions ($n \geq 7$). B) Total leaf area of the 10 accessions that were investigated in water deficit condition ($n \geq 7$). Numbers in brackets represent the genetic groups. C) Phenotypic differentiation for stomata density and area for the 10 Poncirus accessions. Black circle correspond to genotypes belonging to the first genetic group and white circle correspond the second genetic group (for stomatal density $n > 250$ and for stomata area $n > 100$). Values (mean \pm SE) with different letters were significantly different ($P < 0.05$).

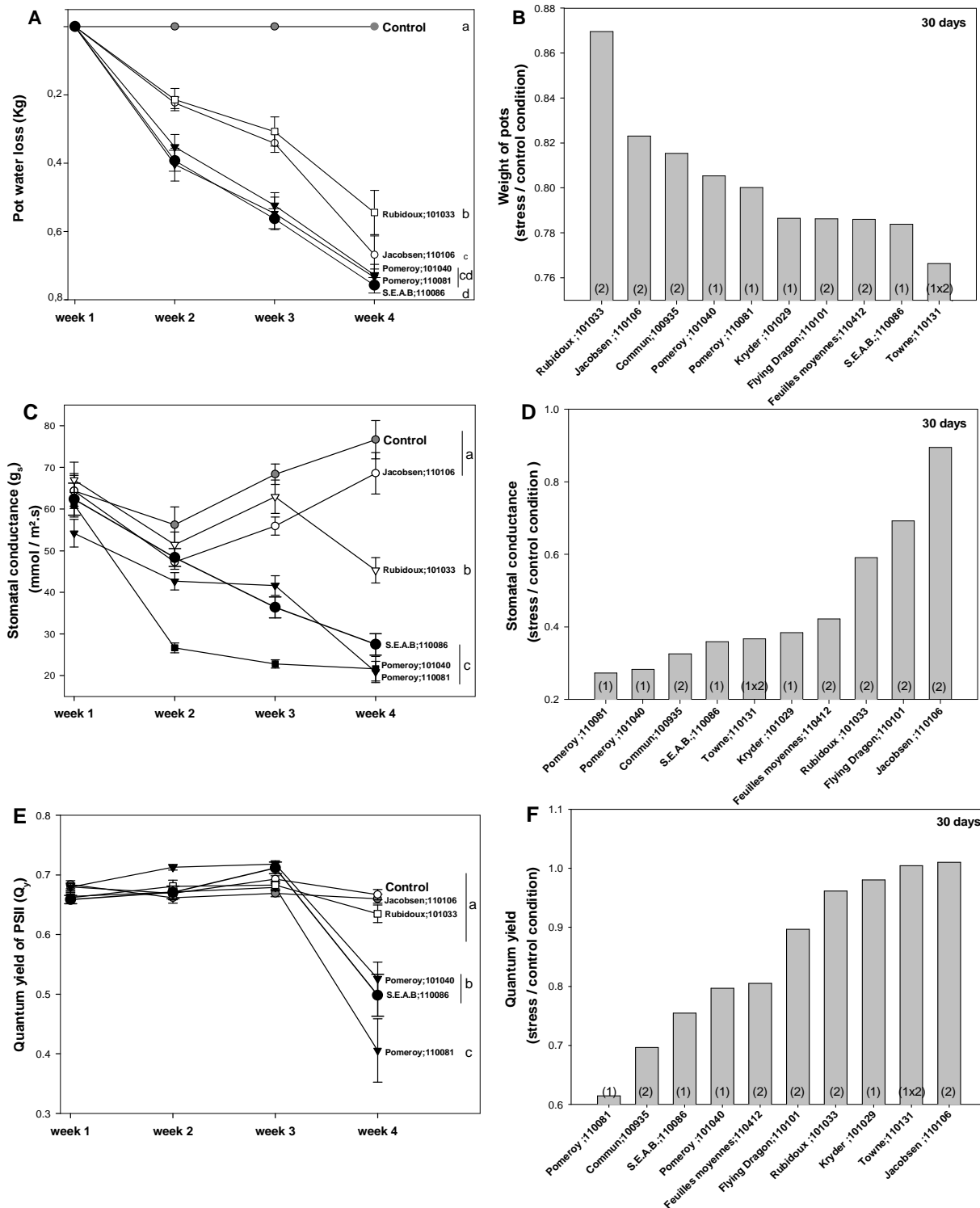


Fig. 4: Physiological parameters investigated in the 10 *Poncirus* accessions subjected to water deficit: stomatal conductance (A, B), quantum yield of PSII (C, D) and pot water loss (E, F). A, C and E plots represent the evolution of each parameter for four weeks of water deficit. For each date, and each parameter, the control represents the mean value for the 10 accessions ($n=21$). B, D and F represent the ratio of each parameter of stressed plants over control plants after 30 days of water deficit. Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P < 0.05$, $n \geq 7$). Numbers in brackets represent the genetic groups.

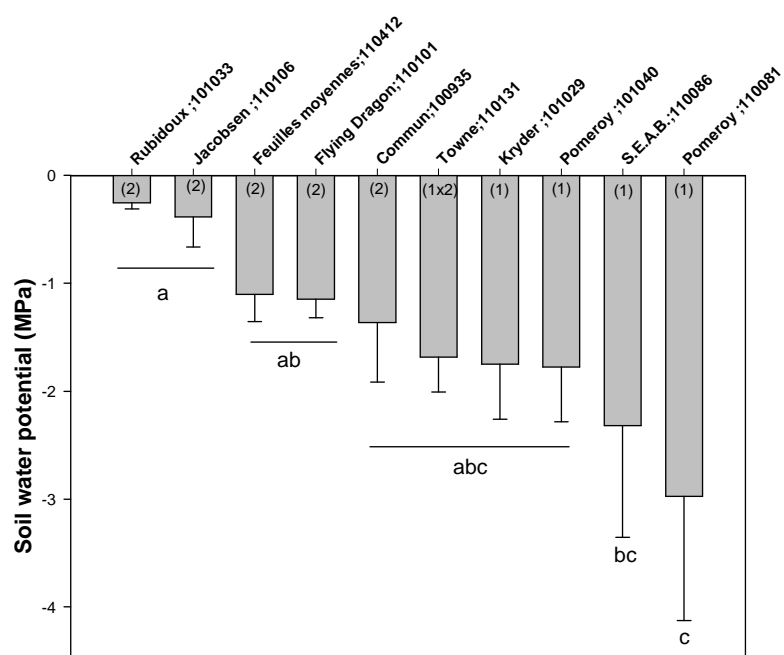


Fig. 5: Soil water potential after 4 weeks of water deficit for the 10 Poncirus accessions (n= 3). Values (mean \pm SE) with different letters were significantly different ($P < 0.05$). Numbers in brackets represent the genetic groups.

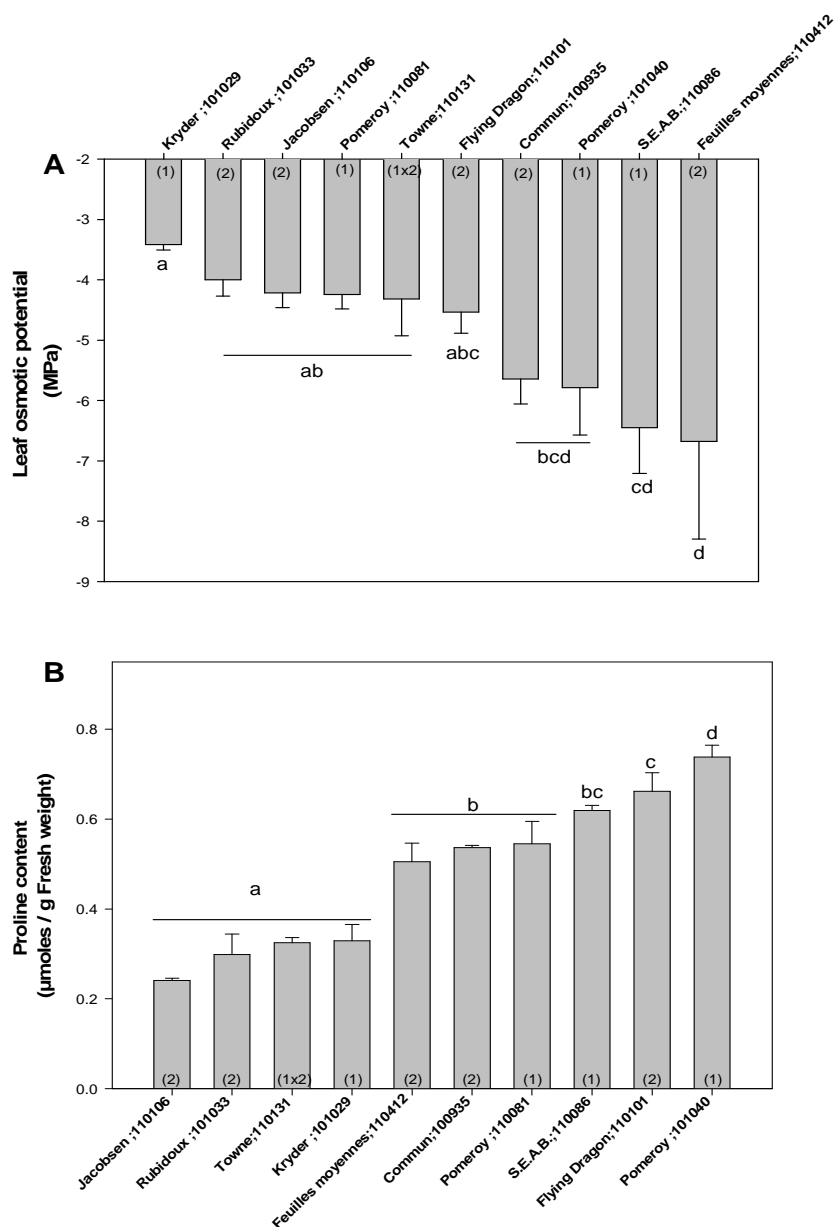
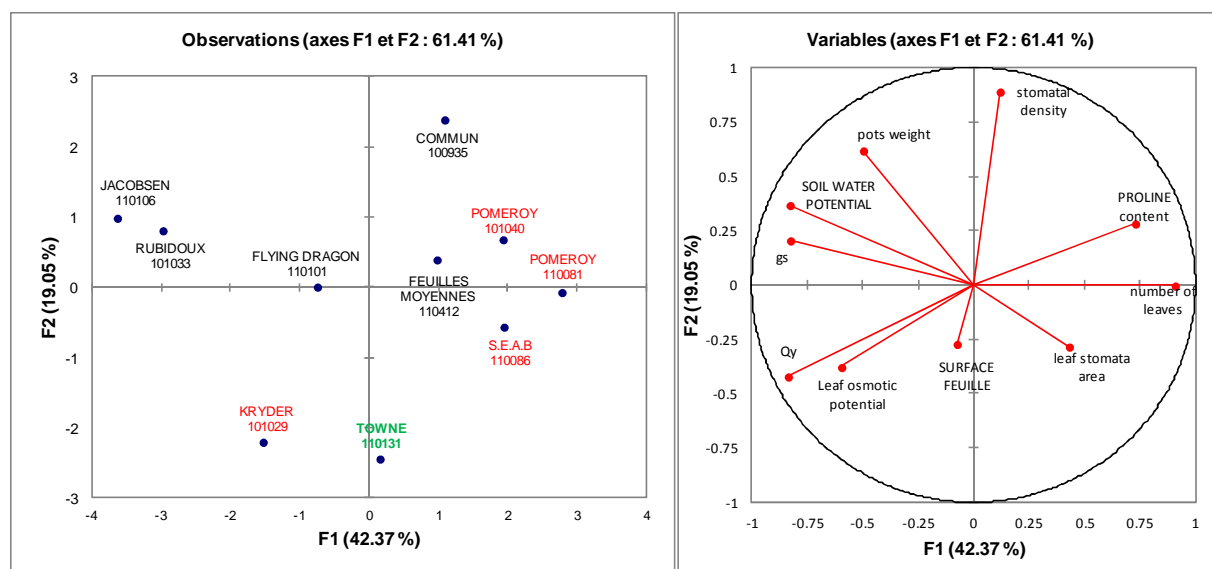


Fig. 6: Leaf osmotic potential and leaf proline content after 4 weeks of water deficit. A) Leaf osmotic potential for the 10 *Poncirus* accessions .B) Leaf proline content for the 10 genotype of *Poncirus* ($n \geq 4$). Values (mean \pm SE) with different letters were significantly different ($P < 0.05$). Numbers in brackets represent the genetic groups.



Contributions of observations (%) :

	F1	F2	F3	F4	F5
Commun;100935	2.803	29.896	7.886	5.046	0.103
Flying Dragon;110101	1.316	0.000	20.139	0.026	7.042
Feuilles moyennes;1104	2.264	0.817	11.094	30.376	0.750
Jacobsen ;110106	31.150	5.120	0.033	6.102	29.522
Kryder ;101029	5.524	25.387	4.492	4.363	13.662
Pomeroy ;110081	18.250	0.025	12.261	33.629	0.166
Pomeroy ;101040	8.815	2.440	3.453	0.572	3.072
Rubidoux ;101033	20.887	3.443	9.633	0.119	35.575
S.E.A.B.;110086	8.933	1.657	5.955	1.273	0.090
Tow ne;110131	0.058	31.214	25.054	18.494	10.019

Fig. 7: Principal component analysis (PCA) established on ten *Poncirus* accessions. The two dimension map represents the distribution of the *Poncirus* genotypes based on their behavior towards water stress according to the genetic groups

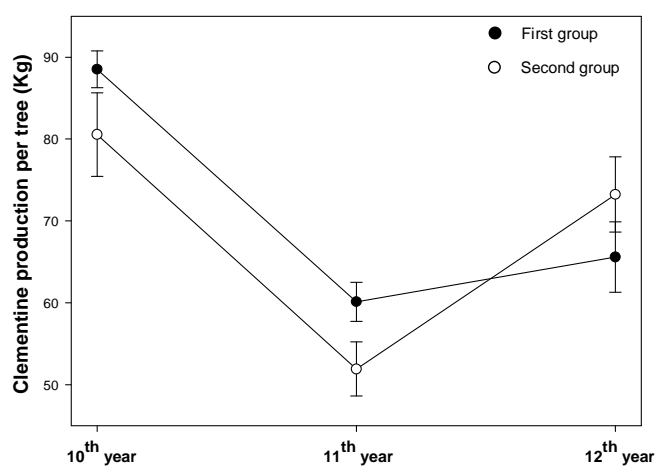
Supp.Tab. 1: Phenotypic differentiation between Poncirus genetic groups for flower size, seed weight and leaf area

Group	Flower Size (mm)					Seed weight (g)					Leaf area (cm ²)				
	Min.	Max.	Mean	SE	Stat.	Min.	Max.	Mean	SE	Stat.	Min.	Max.	Mean	SE	Stat.
1	43.9	65	57.3	7.8	B	0.181	0.269	0.222	0.022	A	14.5	28.9	21.2	3.4	B
2	32.3	59.2	44.8	8.1	A	0.210	0.310	0.252	0.033	B	12.6	23.7	18.9	2.9	A
1x1 or 1x2	53.2	63.5	57.4	4.6	B	0.180	0.240	0.220	0.014	AB	19.0	30.2	20.8	2.0	B
4X	52.1	63.5	58.6	4.5	B	0.310	0.340	0.320	0.021	C	28.3	41.0	33.5	4.8	C

Supp.Tab. 2: Phenotypic differentiation between Poncirus genotypes flower size, seed weight and leaf area

Name of variety	Id Number	origin	Poncirus genetic group	Ploidy level	Flower Size		Seed weight		Leaf area		Petal area	
					Mean (mm)	SE	Mean (mg)	SE	Mean (cm ²)	SE	Mean (cm ²)	SE
Algeria	110277	Algeria	1	2	55.50	4.67	0.19	4.20E-03	20.03	5.37	1.83	0.18
Argentine	1009		1	2			0.22	4.84E-03	24.97	5.85		
Argentine	110079	Argentina SG	1	2	60.53	7.21	0.25	6.08E-03	19.21	6.13	1.98	0.23
Argentine	110275	Argentina SG	1	2	49.40	3.60	0.18	3.04E-03	19.19	4.27	1.97	0.09
Argentine	110276	Argentina SG	1	2	51.00	4.05	0.19	4.65E-03	22.07	0.95	2.16	0.30
Benecke	1021	USA SG	1	2	54.70	6.08	0.25	5.80E-03	19.15	4.59		
Benecke	1028		1	2			0.25	0.01	17.42	3.41		
Benecke	110083	USA SG	1	2	55.30	4.98	0.24	3.72E-03	19.04	6.13		
Benecke	110089	USA	1	2	60.40	5.81	0.20	2.89E-03	21.75	6.62	2.16	0.18
Beneke	1008		1	2			0.19	3.97E-03	28.89	8.95		
Brazil	110091	Brazil	1	2			0.22	2.82E-03	18.64	4.36		
Christian	1023	RSA SG	1	2	57.20	7.43			19.36	2.98		
Christian	110085	USA SG	1	2	58.30	3.89	0.22	5.56E-03	21.79	10.8		
Christian	1026	USA SG	1	2					23.59	5.8		
Christian	110084	Algeria SG	1	2	60.40	6.86	0.23	3.81E-03	25.39	8.62		
Christiansen	110094	USA	1	2	59.80	5.58	0.22	3.21E-03	18.38	6.18	2.96	0.33
Davis	110095	USA	1	2	43.90	5.00	0.27	3.61E-03	19.69	0.83	1.11	0.05
Ferme Blanche	1027	Algeria SG	1	2			0.23	4.74E-03	25.44	6.54		
Ferme Blanche	1039	Algeria	1	2			0.25	7.55E-03	20.7	5.7		
Kryder	1022	USA SG	1	2	60.20	7.08	0.25	4.38E-03	27.53	7.59		
Kryder	1029	RSA	1	2			0.24	2.42E-03	20.45	4.43		
Kryder	110108	USA SG	1	2			0.21	4.22E-03	19.1	6.34		
Grande fleurs	110111	USA	1	2	63.40	5.73	0.21	3.91E-03	24.14	0.88	2.30	0.27
Luisi	110448	France SG	1	2			0.22	4.44E-03				
Menager	1030	France SG	1	2	55.60	7.62	0.24	5.30E-03	20.23	4.2		
Menager	1020	France SG	1	2	55.20	8.00	0.22	6.41E-03	23.36	6.28		
N°4	936		1	2					19.4	3.89		
Pomero	996		1	2					20.29	5.71		
Pomero	1040	USA SG	1	2			0.18	5.13E-03	19.38	5.49		
Pomero	110081	USA SG	1	2			0.21	3.22E-03	19.47	3.78		
Pomero	110119	USA SG	1	2	59.40	6.54	0.21	3.80E-03	16.58	3.04		
Pursha	1041		1	2			0.20	3.59E-03	24.98	7.36		
Rich 12-2	110121	USA	1	2	64.60	7.76	0.24	2.78E-03	23.27	1.15	1.80	0.49
Rich 7-5	110124	USA	1	2	55.60	5.62	0.24	2.67E-03	20.22	1.15	2.45	0.29
Rubidoux	1038	USA SG	1	2			0.24	3.80E-03	23.57	5.08		

Rusk	110437	USA SG	1	2			0.23	4.19E-03				
Rusk	1034	USA SG	1	2			0.23	3.44E-03	21.79	6.02		
Rusk	1037	USA SG	1	2			0.23	5.58E-03	21.3	6.7		
S.E.A.B.	1032	Algeria SG	1	2	58.60	6.81	0.19	6.37E-03	20.79	5.32		
S.E.A.B.	110086	Algeria SG	1	2			0.21	3.96E-03	18.18	4.61		
S.E.A.B.	110471	Algeria SG	1	2	60.10	6.26	0.20	3.93E-03				
USDA	110415	USA	1	2	65.00	6.17	0.20	3.93E-03	19.55	1.11	2.85	0.25
Webber Fawcett	110136	USA	1	2	54.90	3.91	0.22	5.24E-03	21.12	1.16	2.06	0.12
Yamagushi	1024	USA	1	2			0.24	5.92E-03	23.63	6		
Yamagushi	110138	USA	1	2	56.60	5.54	0.24	3.64E-03	26.67	2.45	2.13	0.11
Commun	110133	Japan	2	2	58.6	4.7	0.20	4.70E-03	18.55	1.08	2.04	0.35
Commun	935		2	2			0.29	5.67E-03	22.52	7.2		
English	1035	RSA	2	2	38.1	5.1			23.65	5.89		
English Dwarf	110098	USA	2	2	59.2	5.0	0.24	6.11E-03	20.01	1.26	1.66	0.08
Feuille Moyenne	110412	Japan	2	2	44.4	4.7	0.24	3.80E-03	18.12	5.58		
Feuilles Grandes	110134	Japan	2	2	48.7	3.6	0.25	5.25E-03	19.66	5.5	1.1	0.07
Flying Dragon	110104	USA	2	2					12.57	0.78		
Flying Dragon	1003		2	2					20.11	3.9		
Flying Dragon	110101	USA	2	2	37.0	3.5	0.25	4.90E-03	9.04	0.60		
Flying Dragon	110103	USA	2	2					15.19	3.76		
Jacobsen	110106	USA	2	2	41.7	6.1	0.27	5.60E-03	20.5	1.38	0.77	0.03
Jacobsen	1031		2	2	32.3	3.2						
Pomeroy	110278	France	2	2								
Rich 16-6	110122	USA	2	2	44.1	7.4	0.31	9.49E-03	19.07	1.07	0.75	0.15
Rich 22-2	110123	USA	2	2	45.1	3.3	0.23	0,01	19.25	7.81	1.02	0.03
Rich 22-2	1005		2	2					21.77	5.13		
Rubidoux	110127	USA	2	2					19.77	3.64		
Rubidoux	110128	USA	2	2	48.0	5.5	0.24	4.79E-03	20.3	1.15	1.08	0.11
Rubidoux	1033	RSA SG	2	2			0.29	7.19E-03	19.9	4.42		
Rubidoux SG	997		2	2					16.31	3.72		
Towne	110132	USA	2	2	39.8	5.4	0.21	4.38E-03	19.08	0.92	0.83	0.06
Rich	110414	USA	1x2	2	63.5	7.8	0.22	3.14E-03	21.22	1.74	1.99	0.05
Towne	110131	USA	1x2	2	58.1	4.3	0.18	3.21E-03	18.97	5.41	2.01	0.09
English Dwarf	110099	USA	1x2	2	53.2	3.5	0.24	6.15E-03	19.59	1.03	1.66	0.21
Kryder 8-5	110109	USA	1x1	2	54.6	5.4	0.24	2.57E-03	23.37	5.35	1.77	0.22
Variant	110139	France	1 x Citrus*	2					30.21	4.05		
Rubidoux	1025	USA SG	1	4	63.5	6.3			25	8.9		
Feuille Longue	110413	Japan	2	4	52.1	4.9	0.34	0.0125	40.99	1.93	1.69	0.46
Holansis	110105	China	1	4	61.5	6.8	0.32	7.51E-03	35.82	3.2	2.88	0.26
Pomeroy	110081	USA SG	1	4			0.30	9.02E-03				
Ferme blanche	1039			4					28.69	8.32		
Pomeroy	110278			4					32.48	10.4		



Supp. Fig.1: Production of Clementine fruit evaluated the 10th, 11th and 12th year after planting related to the genetic origin of their rootstocks. The two curves represent the production (mean value \pm SE) of clementine associated with eight varieties of trifoliate orange used as rootstock, of the first genetic group (●) and with six varieties of trifoliate orange of second genetic group (○).

Chapitre 2

**Caractérisation de la tolérance au stress salin de 16
accessions représentatives de la diversité existante
au sein du groupe des mandariniers**

Résumé :

Les mandariniers constituent un groupe génétique important largement utilisé dans les programmes de sélection variétale. Il est également largement utilisé pour générer de nouveaux porte-greffes mieux adaptés aux contraintes abiotiques. D'importants travaux ont été réalisés au cours des dernières décennies afin de démontrer le rôle des mandariniers dans l'évolution des cultivars agrumes et établir une phylogénie phénotypique et génétique. Des études récentes, réalisées à l'IVIA de Valence en Espagne, ont permis de proposer au moyen de marqueurs nucléaires une nouvelle structuration génétique au sein de ce groupe. Cinq principaux groupes parentaux ont pu être identifiés [1): *C. reticulata*; 2: *C. deliciosa*; 3): *C. tangerina*, 4): *C. unshiu*; 5): petite tangerine)]. Du point de vue agronomique, les mandariniers peuvent être répartis en deux grands groupes: le groupe des mandariniers acides qui rassemble les accessions utilisées en tant que porte-greffes comme par exemple le mandarinier 'Cléopâtre' et le groupe mandariniers doux qui rassemble les variétés commercialisées pour le marché en frais. Les mandariniers acides tels que les mandariniers 'Cléopâtre', 'Nasnaran' et 'Shekwasha' présentent une bonne adaptation à certaines contraintes abiotiques. Ces accessions sont toutefois sensibles au virus de la Tristeza (CTV). Ces accessions sont donc largement utilisées en association avec le *Poncirus* (tolérant au CTV) dans les programmes de sélection de porte-greffes afin de cumuler les traits de tolérance biotiques et abiotiques. Jusqu'à présent, l'étude des mandariniers doux s'est focalisée sur la qualité des productions fruitières alors que leurs propriétés intrinsèques de tolérance au stress abiotique restent peu connues.

Dans ce chapitre, en tenant compte des dernières connaissances sur la phylogénie, 16 accessions de mandariniers représentatives de la diversité existante au sein de ce groupe ont été soumises à un stress salin progressif pendant une durée de trois mois. Les paramètres physiologiques tels que : échanges gazeux, potentiel osmotique, teneur en Cl^- des feuilles et des racines ont été analysés. Des échantillons de feuilles ont été également récoltés afin de mesurer les teneurs en H_2O_2 mais également pour mesurer l'activité d'enzymes impliquées dans la synthèse d'espèces actives de l'oxygène ou dans les processus de détoxification. Des comportements très différents ont pu être mis en évidence. Si la plupart des variétés acides, comme par exemple les mandariniers 'Cléopâtre' et 'Shekwasha' ont été identifiés comme étant tolérants avec une translocation limitée de Cl^- de la racine vers les feuilles, ou exclure de Cl^- certaines variétés douces ont montré des traits de tolérance semblables. Certaines accessions présentaient de grande quantité de chlorure foliaire sans toutefois présenter de phénotype de sensibilité. La meilleure tolérance de ces accessions semble être

liée à de meilleures propriétés de détoxication. Enfin, certains traits de tolérance ont pu être liés à l'origine génétique des accessions étudiées. En effet, il semble que les mandariniers ayant hérité des portions de génomes de *C. maxima* ou *Papeda* présentaient une tolérance accrue à la salinité. A partir des résultats obtenus, plusieurs accessions identifiées comme tolérantes sont proposées comme géniteur parental dans les programmes de sélection de porte-greffes et d'autres dans les programmes de sélection de variétés.

Article 2:**Salt stress tolerance in mandarin genotype is related to their parental genetic origin**

Jihène Ben Yahmed^{1,2}; Tahise de Oliveira^{1,2}; Pedro Novillo²; Andres Garcia-Lor²; Alexandra Salvador²; Mehdi Ben Mimoun³; Yann Froelicher¹, Manuel Talon²; Patrick Ollitrault^{1,2}; Raphaël Morillon^{1,2*}

¹CIRAD, UMR AGAP, Avenue Agropolis - TA A-75/02 – 34398 Montpellier cedex 5, France

²IVIA, Ctra. Moncada-Náquera Km 5, 46113 Moncada, Valencia, Spain

³INAT, 43, Avenue Charles Nicolle 1082 –Tunis - Mahrajène Tunisia

***Corresponding author:** Raphaël Morillon, CIRAD, UMR AGAP, Avenue Agropolis - TA A-75/02 – 34398 Montpellier cedex 5, France

Abstract

Mandarin is an important genetic group in citrus largely used for variety breeding programs and also to generate new rootstocks better adapted to abiotic stress. In the present work, 16 mandarin accessions representative of the diversity existing in this group were analyzed for their properties of tolerance to salt stress. Physiological parameters such as gas exchanges, osmotic pressure, leaf and root Cl^- contents were analyzed. Samples were also harvested to characterize the presence of H_2O_2 as well as the activity of enzymes involved in ROS synthesis and detoxification processes. Very different behaviors were noted. If most of the acid cultivars that are used as rootstocks such as *C. reshni* Hort. ex Tan. ‘Cleopatra’ or *C. depressa* Hayata ‘Shekwasha’ observed to be tolerant with a limited translocation of Cl^- from root to shoot, some sweet varieties showed similar traits of tolerance. Some accessions, presented large leaf Cl^- contents that were not always associated with sensitivity traits but were correlated with better detoxification processes. Interestingly, we identified sensibility/tolerance traits we identified that were related to the genetic origin of the genotypes. Mandarin accessions which inherited parts of *C. maxima* or *Papeda* appeared were showed to be tolerant. To conclude, some of the tolerant cultivars we identified could be potentially used as parental genitors in rootstock breeding programs and others in variety breeding programs.

Key words: Citrus, diversity, mandarin, salt stress

Introduction

Mandarins represent the third most important fresh-fruit market worldwide behind bananas and grapes (Agrochart, 2013). This is a highly polymorphic horticultural group that is closely related to the basic taxa of cultivated citrus (*Citrus reticulata*). Extensive works were performed in the last decades to decipher the role of mandarins in citrus cultivars evolution (Froelicher, 2011; Nicolosi, 2000) as well as to establish phenotypic and genetic phylogeny (Swingle and Rice, 1967; Mabberley et al., 1997; Nicolosi and al., 2000, Garcia-Lor et al., 2012, Garcia-Lor et al., 2013). Garcia-Lor et al. (2013) characterized the mandarin germplasm using nuclear and mitochondrial markers in order to establish the genetic structure within the mandarin group. This recent study demonstrated that *C. maxima* and *Papeda* were the main genomes introgressed in *C. reticulata* background of the mandarin germplasm. Also, at nuclear level, five main parental groups were identified [1): *C. reticulata*; 2: *C. deliciosa*; 3): *C. tangerina*; 4): *C. unshiu*; 5): small tangerine)] and two groups composed of genotypes known or supposed to be hybrid were identified. Mitochondrial origin analysis revealed two cytoplasmic groups of pure mandarins that can be named as sweet and acidic groups of genotypes and two interspecific mandarin hybrid groups.

The impact of salinity on plant growth and development is associated with a decrease of the osmotic potential, accumulation of Cl^- and Na^+ ions to toxic levels, and nutritional imbalances (Byrt and Munns, 2008), leading to a reduction in plant growth and fruit yields (Storey and Walker, 1998). After stomata closing and a consecutive limitation of photosynthesis, plants regulate their osmotic potential which involves several processes such as the uptake of K^+ , compartmentalisation of Na^+ and Cl^- into the vacuole and apoplast, and the synthesis of compatible solutes (Ashraf, 1994). A secondary effect of toxic ions, along with salt stress, is the triggering of oxidative stress (Gómez-Cadenas et al., 1996; Gueta-Dahan, 1997; Tanou et al., 2009), which causes damage to the leaf photosynthetic machinery. The adverse effects of salinity on commonly used citrus genotypes have been extensively reported in the literature (Atmane et al., 2003; Garcia-Sanchez and Syvertsen, 2009; Lopez-Climent et al., 2008; Saleh et al., 2008, Hussain et al., 2012) and included symptoms of leaf injury, growth suppression and fruit yield decline. Acid mandarins: such as ‘Cleopatra’ and ‘Sunki’ (*C. reshni* Hort. ex Tan., *C. sunki* Hort. ex Tan., respectively) are considered to present good adaptation to biotic and abiotic constraints (Maas, 1993; Moya et al., 2002 ; Brumos et al., 2009; Gimeno et al., 2009) that may promote quality depending of the variety used and the site of the cultivation (Campbell and Lincoln, 1962, Hardy, 2004)

and are characterized by a high degree of polyembryony. However, these genotypes are sensitive to diseases such as *Phytophthora* and *Citrus Tristeza Virus* (CTV) which limit nowadays their use as rootstocks.

Contrary to most other plants, citrus damage caused by salinity is usually associated with Cl^- accumulation but not with sodium accumulation (Banuls et al., 1997; Moya et al., 2003). Trifoliate orange that belongs to the *Poncirus trifoliata* genus and its hybrids confer tolerance to CTV and are considered poor Cl^- excluders (Cooper, 1961), although they have a great capacity to exclude Na^+ at low salinity levels (Walker, 1986). ‘Cleopatra’ mandarin was shown to be Cl^- excluder (Cooper et al., 1952; Zekri and Parsons, 1992), thus explaining the salt-tolerant nature of this rootstock. According to Moya et al. (2003), if Cl^- absorption is not limited at the root level, the ions will be translocated to the leaves via the transpiration stream and will cause necrosis and even defoliation. Accessions such as ‘Cleopatra’ and ‘Sunki’ mandarin in association with Trifoliate orange are then widely used in rootstock breeding programs to accumulate biotic and abiotic traits of tolerance.

Till now, the interest in sweet mandarins has mainly been focused on fruit quality criteria and little is known regarding their inherent properties of tolerance to abiotic stress. Recently, very different traits of sensibility/tolerance were reported in a study dedicated to the characterization of the salt stress tolerance of citrus genotypes representing different *Citrus* species as well representatives of the two other citrus genus (Hussain et al., 2013). Citrus ability to tolerate salt stress seems to be strictly dependent on the capacity of the genotypes to reduce central metabolic processes related with carbon utilisation and toxic ions exclusion (Brumos et al, 2009). Traits of tolerance appeared to be present only in the *Citrus* genus and mainly in two fundamental species, *C. reshni* (mandarin) and *C. maxima* (pummelos). Combava (*C. hystrix*), a member of wild *Citrus* species grouped within the subgenus *Papeda* was found to be quite tolerant to salt.

In this report, taking into account the last knowledge about the mandarin phylogeny, 16 accessions representative of the mandarin germplasm were subjected to progressive salt stress for almost three months. Salt stress tolerance properties of the different cultivars are discussed taking account of their parental genetic origin, as well as their potential usefulness for rootstock and variety breeding programs.

Materials and methods

Seeds of sixteen mandarin accessions, representative of the diversity in this *Citrus* group, were provided by the INRA-CIRAD station of Corsica, France (Table 1). Plant

materials were propagated by sowing seeds in a neutral substrate (perlite). Seedlings were transplanted 4 months after germination into 3-litre pots in a mixture of sand, turf and peat (1:1:1) and regular fertilization was applied according to Allario et al. (2011). The ploidy status of seedlings was confirmed by flow cytometry (Partec I) according to Froelicher et al. (2007). Trees were then grown for 8 months in a greenhouse under natural photoperiod conditions.

Plant growth, root and stem weight

One year seedlings were pruned to get homogenous canopy volume. Plant height was then measured each three weeks along the stress. At the end of the experiment, root and stem weights were determined.

Salt stress application

Stress experiment was performed from April to July 2012 under natural photoperiod conditions, with day/night temperatures of 19–32 °C/16–18 °C, respectively, and relative humidity varying between 60 and 85%. Ten seedlings of each accession (total of 160 plants) were assigned at random into two blocks. Five seedlings per accession were assigned for salt treatment and the others were assigned as control plants.

Salt stress was applied by watering plants twice a week at the same hour, either with 0.5 L of water for control plants, or with 0.5 L of water supplemented with NaCl, until excess solution ran out of the pot. Concentration and duration of salt stress were applied as follows: 30 mM of NaCl for 1 week, 50 mM for 1 week, 70 mM for 1 week and 90 mM for 8 weeks. Under those conditions, pots were watered to field capacity and the water potential applied was mostly dependent on the concentration of the salt solution. Three leaves per plant the same height and same developmental stage were tagged randomly. These 3 leaves were used for the periodic measurement of the studied parameters.

Gas exchange measurements and leaf nitrogen content

The measurements of net photosynthetic rate (A), and stomatal conductance (g_s) were made on 15 tagged leaves using an infrared gas analyzer (ADC LCPpro, UK) at a photo synthetically active radiation photon fluxes of $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Measurements were performed once a week in the morning (from 8 to 11 AM) to avoid high external temperature and low humidity. Leaf nitrogen content was determined using a N Pen (N 100, Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic).

Chloride contents, leaf osmotic potential and leaf area estimation

Leaf samples were regularly collected to estimate Cl^- content, the osmotic potential and perform enzymatic assays. Five leaves of three different plants were dried for 24 hours at 80°C to estimate Cl^- content. At the end of the experiment, 3 independent root samples were also collected, cleaned and dried at 80°C for 48 hours. Leaf and root Cl^- contents were measured according to Iglesias et al. (2004) and are expressed in mg g^{-1} of dry weight.

The leaf osmotic potential was estimated according to Callister et al. (2006). Briefly, five leaves per plant and per accession were collected and immediately stored in a humid box prior to be weighed one by one and dried for 24 hours at 80°C . Each leaf was then reweighed and ground in a microtube using glass beads. Deionized water was then added to get a weight/volume ratio equal to 10. Microtubes were then put at 90°C for 1 hour. After cooling, the osmotic potential was measured using a vapor pressure osmometer (model 5500, Wescor, Logan, UT).

Assay of detoxification enzymes and reactive oxygen species

Leaf catalase and peroxylase activities

For the Catalase (CAT) and Peroxylase (POD) assays, extractions were performed according to the method of Novillo et al. (submitted for publication). Briefly, 0.5 g of leaves frozen at -80°C was grounded in liquid nitrogen and homogenized with 10ml of 50mM sodium phosphate buffer (pH 7) containing 1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 2 mM dithiothreitol (DTT) and 10g L^{-1} polyvinylpyrrolidone (PVPP). Thereafter, homogenates were centrifuged at 12,000 rpm for 25 min at 4°C . The supernatants were used for enzymatic assays.

One unit of CAT activity was defined as the amount of enzyme that decomposed 1 μmol of $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$. This involved monitoring the disappearance of H_2O_2 by recording the drop in absorbance at 240 nm of a reaction mixture containing 50 mM of sodium phosphate buffer (pH 7), 90 mM of H_2O_2 and 0.5 ml of CAT extract. The molar extinction coefficient of H_2O_2 at 240 nm was taken as $40\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Duan et al., 2011)

One POD unit was defined as the amount of enzyme that caused an increase in OD_{470} per min under the assay conditions, and enzyme activity was expressed in units per gram of FW per minute. The reaction mixture contained 50 mM of sodium phosphate buffer (pH 7), 90 mM of H_2O_2 and 2% guaiacol. The reaction was initiated by the addition of 0.3 ml of POD extract. A molar extinction coefficient of $26.6\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Duan et al., 2011) was used to calculate activity.

Leaf Superoxide Dismutase activity

Superoxide Dismutase (SOD) activity was assayed according to the protocol established by Novillo et al. (2013) (not yet published). This SOD method is based on the superoxide-dependent reduction of nitroblue tetrazolium (NBT). The method chosen to generate superoxide radical is the enzymatic oxidization of xanthine to uric acid by xanthine oxidase (Sigma-Aldrich).

Total SOD was extracted from 0.5 g of frozen grounded leaves. The reaction mixture contained 50mM sodium phosphate buffer (PH 7,8), 1,33mM diethyl-triamino-pentaacetic acid (DETAPAC), 2,24mM NBT solution, 1,8mM xanthine solution, 40U/ml Catalase from bovine liver, 0.1ml of tissue extract, and the reaction was initiated by the addition of 0,1ml xanthine oxidase.

The absorbance of assay mixture was measured at 560nm. Assay mixture without tissue extract was used as a control. One enzyme activity unit was defined as the amount of enzyme that inhibited the photoreduction of NBT by 50% (units g⁻¹ FW).

H₂O₂ leaf content

0.5 g of frozen leaf was ground, homogenized with 2.5 ml of trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4°C, previous to be filtered on 0.45µm filters. 0.5 ml of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 1 ml of potassium iodide was added to 0.5 ml of the filtrate. The amount of H₂O₂ was estimated using a standard curve established at $\lambda = 390$ nm.

Statistical analyses

Data are expressed as means \pm SE and were analysed with SIGMASTAT (SPSS, Chicago; www.spss.com_software_science). The diversity analysis was drawn up by MAPCHART and DARWIN. The principal component analysis (PCA) are made using XL STAT. An ANOVA was used to detect differences between mandarins. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Recently, Garcia- Lor et al. (2013) proposed a more detailed genetic structure for mandarin accessions based on nuclear and mitochondrial markers. In our work, 16 mandarin accessions representative of the diversity were selected to be evaluated for salt stress tolerance. On supplemental Fig. 1 is presented a DARwin representation (Perrier et al., 2006)

of the genotypes added to the four parental mandarin populations: five different groups can clearly be identified as well as hybrids. Table 1 represents the percentage of parental origin for each mandarin accession based on the results published by Garcia-Lor et al. (2013). Some genotypes clearly result from hybridization of mandarins groups with *C. maxima* or *Papeda*, such as ‘Temple’, ‘Anana’ and ‘Nasnaran’. On supplemental Fig. 1 is represented the nuclear, mitochondrial and chloroplastic diversity of mandarin accessions and ancestral parents investigated in the present study based on Garcia-Lor et al. (2013) results. Mitochondrial markers suggest that mandarin accessions we investigated can be split in three different mitotypes.

Ploidy status of mandarin seedlings investigated for salt tolerance

Using flux cytometry, only two doubled diploid Cleopatra mandarins were identified among all mandarin seedlings. These two seedlings were removed from the experiment.

Physiological response of seedlings to stress

Leaf symptoms and plant growth after 11 weeks of salt stress

Symptoms observed for the different mandarin accessions are presented in Table 2. In all mandarin groups, sensitive genotypes presenting leaf fall were observed. After 11 weeks of stress, leaf damage symptoms such as necrosis and yellowing were noted for all accessions (Table 2).

Accessions that presented the more limited symptoms of leaf fall were ‘Dancy’, ‘San Hu Hong Chu’, ‘Nanfen Miguan’, ‘Bintangor Sarawak’, ‘Vietnam’, ‘Temple’ and ‘Cleopatra’. On the contrary, ‘Beauty’, ‘Fuzhu’, ‘Willow leaf’ and ‘King of Siam’ were much more affected. The strongest symptoms of yellowing and leaf fall were noted for ‘Willow leaf’ and ‘Beauty’.

Symptoms of leaf yellowing and burn on the borders and extremities were observed for ‘Sarawak’ and ‘Anana’. ‘King of Siam’ presented also leaf fall but less severe symptoms of chlorosis. Limited chlorosis accompanied by burn at leaf extremities were noted for ‘Temple’ even though symptoms were less homogenous when compared to other accessions from one plant to another. Leaf burn and yellowing of ribs were noted for some accessions such as ‘Nasnaran’, ‘Willow leaf’ and ‘Beauty’. Also leaf curling was observed in ‘Fuzhu’, ‘San Hu Hong Chu’, ‘Shekwasha’ and ‘Cleopatra’.

Reduction of plant growth was observed after 6 weeks (Fig. 1). For clarity purposes, only a few accessions representing plant growth were selected to be plotted on Fig. 1A.

Accessions choice was made to be representative of the mandarin diversity. Also, for each accession, value ratios of scion growth after 11 weeks of stress over plant growth in control conditions were organized according to genetic data related to membership mandarin groups (Table 1 & Fig. 1B). ‘Dancy’ was the only accession with a ratio higher than one, while ‘Beauty’ and ‘Nanfen Miguan’ were the more affected accessions with 30% decrease of plant growth. Comparison of stem and root weights at the end of the experiment allowed the characterization of seedling growth and development (Fig. 1C). ‘Sun Hu Hong Chu’, ‘Nanfen Miguan’ and ‘Willow leaf’ presented the smaller stem weight while ‘Bintangor Sarawak’, ‘Temple’ and ‘King of Siam’ presented almost two times larger stem development. At root level, ‘Willow leaf’ and ‘Nasnaran’ showed the smallest root mass. ‘Temple’ roots were almost twice heavier (Fig. 1C). Stem/Root weight ratios were close to 1 for almost all accessions except for ‘Willow leaf’, ‘Bintangor Sarawak’, ‘Shekwasha’, ‘Cleopatra’ and ‘Nasnaran’ that showed stems 50 to 100% heavier than roots (Fig. 1D).

Gas exchange parameters

An illustration of the changes of stomatal conductance (g_s) and net photosynthesis (A) for the representative accessions is presented in figure 2A and C. Ratios presented on figure 2B and D represent g_s and A values measured after 11 weeks of stress over the control condition respectively. Stomatal conductance decreased after three weeks of salt treatment for nearly all accessions. The most significant decreases in g_s (about 80%) were observed in ‘Willow leaf’ and ‘Nasnaran’, while g_s ratio values in ‘King of Siam’, ‘Anana’ and ‘Bintangor Sarawak’ were less than 40% (Fig. 2B). Results regarding net photosynthetic rate (A) showed patterns very similar to g_s for all of the accessions studied. ‘King of Siam’ and ‘Anana’ were the two accessions that maintained the higher A values which were close to the one of controls, while ‘Willow leaf’, ‘Beauty’ and ‘Nasnaran’ presented decreases close to 80% (Fig. 2C). Regarding WUE_i , while most accessions maintained values higher than 60 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol H}_2\text{O}$, ‘Ponkan’, ‘Beauty’ and ‘Anana’ presented values close to 40 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol H}_2\text{O}$ (Fig. 2E).

Estimation of leaf nitrogen content, leaf and root chloride contents

Leaf nitrogen content was monitored along the stress (Fig. 3). At the end of the experiment, ‘Fuzhu’, ‘Temple’ and ‘Shekwasha’ presented leaf nitrogen content ratio (stress/control) less than 15% (Fig. 3B) while ‘Willow leaf’ and ‘Anana’ presented reduction of about 40%. Other accessions showed reduction from 20 to 35%.

‘Cleopatra’, ‘Shekwasha’, ‘San Hu Hong Chu’ and ‘Sun Chu Sha’ belong to the group of accessions with little leaf Cl^- accumulation (Fig. 4A & B). The largest leaf Cl^- content in leaves (48 mg/g DW) was observed in ‘Nasnaran’ (Fig. 4B), while ‘Fuzhu’, ‘Ponkan’ ‘Nanfen Miguan’, ‘Willow leaf’, ‘Bintangor Sarawak’, ‘Beauty’, ‘Nasnaran’, and ‘King of Siam’ accumulated Cl^- to a rate lower than 25 mg/g DW. Interestingly, ‘King of Siam’ was the only accessions accumulating very large Cl^- contents in roots (43 mg/g DW), (Fig. 4C), other cultivars presenting accumulations bellow 20 mg/g DW. Some cultivars such as ‘San Hu Hong Chu’, ‘Vietnam’, ‘Sun Chu Sha’, ‘Shekwasha’, and ‘Cleopatra’ that accumulated a lot of Cl^- in root were also the ones that presented the more limited leaf Cl^- contents. However, other accessions that were poor root Cl^- accumulators were able to translocate toxic ions to aerial parts (Fig. 4B). Indeed, ‘Fuzhu’, ‘Nanfen Miguan’, ‘Willow leaf’, ‘Beauty’ and ‘Nasnaran’ presented leaf/root Cl^- ratios ranging from 2 to 3. Conversely, ‘Cleopatra’ tolerant accession presented leaf/root chloride ratio bellow to 1.

Leaf osmotic potential

Evolution of the osmotic potential in leaves along the stress was also estimated (Fig. 5A and 5B). The lowest osmotic potential was observed for ‘Fuzhu’, ‘Willow leaf’ and ‘Beauty’: the osmotic potential for these accessions reached an average value close to -6 MPa (Fig. 5A). At the end of the stress, unlike ‘Fuzhu’, ‘Willow leaf’ and ‘Beauty’; ‘Nanfen Miguan’ and ‘Bintangor Sarawak’ presented much lower stress/control leaf osmotic potential ratios (Fig. 5B).

Catalase, Peroxydase and Superoxide Dimustase activities in leaves and H_2O_2 leaf content

‘Cleopatra’, ‘Bintangor Sarawak’ and ‘Ponkan’ showed the lowest values of CAT activity under control conditions and they remained low under salt stress for 5 or 11 weeks. ‘Dancy’, ‘Shekwasha’ and ‘Beauty’, in which the CAT activity was the highest in the control treatment, the values decreased to 50% along the salt stress. Salt stress led to a slight increase in some accessions as ‘Temple’ and ‘Willow leaf’. For other accessions, no relevant differences in CAT activity among treatments were detected.

POD activity of all accession under control conditions ranged from values close to 2.000 unit/gFW in ‘San Hu Hong Chu’ and ‘Nasnaran’ to values close to 6.500 unit/gFW in ‘Shekwasha’, ‘Temp’ and ‘Danc’. Most accessions remained or decreased the POD level

values throughout salt stress, nevertheless in some of them such as ‘Ponkan’ and ‘Nasnaran’ increase of POD activity was observed with salt stress.

In general an increase in SOD activity were observed after 5 weeks of salt stress respect to the control conditions and then the values decreased after a longer stress of 11 weeks. ‘Fuzhu’ and ‘Shekwasha’ were the only accessions that showed a gradual increment of SOD activity with the duration of salt stress. Other accessions, such as ‘Bintangor Sarawak’, ‘Vietnam’ and ‘Temple’ presented a quite high SOD activity and remained unchanged during salt stress.

Leaf H_2O_2 content was estimated at the beginning and after respectively 5 and 11 weeks of salt stress (Fig. 7). Under control condition, H_2O_2 varied among accessions ranging from values below 1.5 mmol.g⁻¹ FW in ‘Dancy’, ‘Temple’, ‘Cleopatra’ and ‘Nasnaran’ to values above 2.3 mmol.g⁻¹ FW in ‘Ponkan’, ‘Willow leaf’ and ‘Bintangor Sarawak’. While ‘Cleopatra’ and ‘Beauty’ showed an increase of H_2O_2 content along the stress, ‘Willow leaf’ and ‘Shekwasha’ exhibit a decrease. Vietnam’, ‘Dancy’ and ‘Nanfen Miguan’ showed an increase in the levels of H_2O_2 during the five first weeks of salt stress and these values (> 2.1 mmol.g⁻¹ FW) remained unchanged after 11 weeks. ‘Bintangor Sarawak’, ‘Ananas’ and ‘Sun Chu Sha’, did not exhibited relevant changes in the H_2O_2 content along the stress. Meanwhile Ponkan presented a transitory decrease the fifth week of stress but an important increase (values > 2.5 mmol.g⁻¹ FW) at the end of the experiment compared to control, ‘Fuzhu’, ‘San Hu Hong Chu’, Temple’, ‘Nasnaran’ and ‘King of Siam’ showed a rise the fifth week and a decline at the end of the stress.

Discussion

Most of the citrus rootstocks used in the citrus industry belong to the *Citrus* and *Poncirus* genera and present tolerance traits to biotic and abiotic stress. Among *Citrus*, some mandarins known as acidic cultivars are widely used since they provide tolerance to abiotic constraints. ‘Cleopatra’ and ‘Sunki’ rootstock cultivars have been extensively investigated for their properties of tolerance to salt stress (Ollitrault et al., 2003; Hardy, 2004; Gimeno et al., 2009). However, little is known regarding salt tolerance of other acidic mandarin accessions such as ‘Shekwasha’, ‘Nasnaran’ or sweet mandarins. In the present work, we investigated 16 mandarin accessions belonging to the different nuclear genetic groups identified by Garcia-Lor et al. (2013), for salt stress tolerance in order to verify if the identified phenotypic trait of tolerance/sensitivity could be cross related to diversity analysis and also could orientate positively our rootstock and variety breeding programs. Based on

the work of Garcia-Lor et al. (2013), the genetic organization of the mandarin group (*C. reticulata*; Swingle and Reece, 1967) is quite complex (Supplemental Fig. 1). ‘Ponkan’, ‘Willow leaf’, ‘Beauty’ and ‘Cleopatra’ mandarins are clustered in separate specific groups (Sup. figures 1 and 2A, Table 1). The nuclear markers suggest that little introgression from one group to another or from other ancestral genomes such as *C. maxima* or *Papeda* happened. Conversely, all the other accessions we investigated presented at least 10 % introgression due to other mandarin groups and/or from *C. maxima* or *Papeda*. Whole genome sequencing of all mandarin should give a clear view regarding the possible introgression events that may have occurred. Indeed, recent works demonstrate that in ‘Willow leaf’ or ‘Ponkan’ introgression by *C. maxima* do also exist (Gmitter et al. 2012; Xu et al., 2013). In the absence of whole genomic information related to all the mandarin accessions we investigated, genetic data from Garcia-Lor and al. (2013) were used to organized membership mandarin groups (Table 1). Regarding the cytoplasmic origin, using mitochondrial markers, mandarins can be split in three groups: the sweet mandarins, the acidic ones and ‘Nasnaran’ that seems to belong to a group of interspecific hybrids (Sup. Fig.2B). Chloroplast markers showed that except ‘Nasnaran’, all other accessions are clustered in a same group (Sup. Fig. 2C). (Cheng et al. 2005).

Physiological traits of tolerance to salt stress

In citrus, damages caused by salinity are mainly associated with the accumulation of Cl^- and not Na^+ (Banuls et al., 1995; Moya et al., 2003). Hussain et al. (2012) confirmed that within the citrus diversity, the presence of Cl^- in leaves was well correlated with the sensitivity of genotypes. The physiological responses to alleviate salt stress would be then strongly related to plant’s ability to restrict Cl^- transport from the root to the shoot (Iglesias et al., 2004; Moya et al., 2003; Moya et al., 2002; Romero-Aranda et al., 1998; Storey and Walker, 1998).

Investigation of mandarin accessions when subjected to salt stress showed that many contrasted phenotypes can be observed. Accessions clustered as acidic (group 5) did not present much leaf fall symptom neither chlorosis (Table 2) and showed limited translocation of Cl^- from root to leaf (Fig. 4B, D). Interestingly, sweet mandarin cultivars such as ‘San Hu Hong Chu’ and ‘Vietnam’ with limited symptoms of leaf fall poorly translocated Cl^- to leaf suggesting that these accessions may present interest for rootstock breeding programs. Conversely, accessions presenting the more severe symptoms of leaf fall and chlorosis such as ‘Fuzhu’, ‘Willow leaf’, ‘Beauty’, ‘King of Siam’ and ‘Nasnaran’ translocated the highest

rates of Cl^- from root to leaf (leaf/root Cl^- ratio ≥ 2). In a study aiming to investigate physiological and molecular determinants of salt stress tolerance in diploid and doubled diploid ‘Willow leaf’, we observed that ‘Willow leaf’ was not a Cl^- excluder as ‘Cleopatra’ (Zekri and Parsons 1992; Moya et al. 1999) and was thus much more sensitive to salt stress (Mouhaya et al, 2010). Based on these data, it is clear that these high leaf Cl^- accumulators can’t be considered as good parental genitors for rootstock breeding programs. However, we can’t cut short whether they can be good parental genitors for variety breeding programs.

‘King of Siam’ and ‘Nasnaran’ accumulated the highest rates of leaf and root Cl^- (Fig. 4) and presented symptoms of leaf fall while remaining leaves were still green (Table 2). This behaviour could be characterised as a specific defence mechanism that involves an evasive action to eliminate leaves that have accumulated toxic ions and maintain younger leaves to preserve photosynthesis and plant growth (Arbona et al, 2003; Iglesias et al, 2007; Arbona et al, 2009). On the other hand, accessions may have developed other mechanisms to cope with salt stress. In all accessions salt stress condition induced to a general increase in the H_2O_2 levels. Interestingly, in ‘King of Siam’ and ‘Nasnaran’, this increase of the H_2O_2 levels only was detected after 5 weeks, since an important decline was exhibited after 11 weeks, which could be related to the increase of CAT activity, playing this ROS enzyme an important role in H_2O_2 scavenging. This suggests that for these high Cl^- accumulators, detoxification processes may also be part of the stress adaptation response. On the other hand ‘Ponkan’, the accession with the highest leaf H_2O_2 content ($\sim 3 \text{ mmol/g FW}$), after salt stress showed the lowest CAT activity ($< 10 \text{ unit/g FW}$) associated to a quite high leaf Cl^- content ($> 20 \text{ mg/g DW}$) as well as strong leaf yellowing symptoms, but an increase in POD activity was exhibited. In Fuzhu’, ‘Willow leaf’ and ‘Beauty’, accessions that also showed severe symptoms of leaf fall and chlorosis, no important changes in CAT and POD activity were shown, but SOD activity slightly enhanced.

Another point to note is that in the more salt-stress tolerant accessions, with lower symptoms (Dancy, Sun Hong Hu Chu, Cleopatra, Anana) in general, the changes in CAT and POD activities were less pronounced with lower values after stress periods, nevertheless some rise in SOD activity during salt-stress were observed. These results indicate that salt-stress triggers oxidative stress and the antioxidant enzymes may play a role in the damage symptoms in leaves and roots of salt-stressed plants.

Stomatal closure is the most common cause of the reduction in the photosynthetic capacity of leaves (Meloni et al., 2003). Correlations between the decrease in CO_2 assimilation and high Cl^- and Na^+ contents in leaves were previously reported in citrus

genotypes (Anjum, 2008; Garcia-Legaz et al., 1993; Walker and Douglas, 1983). Toxic ions accumulation in the leaf may significantly impact different critical processes that are essential for plant survival, including A , g_s and WUE_i . Except 'Anana', 'Bintangor Sarawak' and 'King of Siam', which maintained high A and g_s values (Fig. 2) associated to a quite high leaf Cl^- content (from 15 to 25 mg/ g DW, Fig. 4B) and stem development (Fig. 1), other accessions such as 'Nanfen Miguan', group 4, 'Sun Chu Sha', 'Shekwasha' and 'Nasnaran' reduced A and g_s by about 60% (Fig. 2). Other accessions such as 'Fuzhu', 'Dancy', 'San Hu Hong Chu', 'Bintangor Sarawak', and 'Cleopatra' were minus affected with a 50% decrease of A . The highest decrease of WUE_i were observed for 'Beauty', 'Ponkan' and 'Anana' which presented a 60% decrease, suggesting that these cultivars were not able to limit their water loss contrary to other accessions (Fig. 2E). Studies performed by Brumos et al. (2009) on the mechanisms regulating the homeostasis of Cl^- in 'Carrizo' citrange and 'Cleopatra' mandarin showed that the best tolerance behavior was noted in the genotype able to exclude Cl^- at root level. Also, salt stress tolerance of 'Cleopatra' mandarin was proposed to be associated to other defensive mechanisms including a decrease of the photosynthesis and stomatal conductance, leading to a repression of central metabolic processes such as carbon utilisation, and finally a more limited growth. In our hands, accessions of group 2 presented the more limited stem growth while 'Willow leaf' and 'Nasnaran' were the more affected at root level (Fig.1 A&B). In these last accessions, the largest decreases of A and g_s was associated to highest leaf Cl^- content (≥ 20 mg/g DW) (Fig. 1). Analysis of stem/root ratios suggest that most of the accessions regulated stem biomass in the same manner than root biomass and showed a ratio close to 1. However, for some accessions such as 'Willow leaf', 'Bintangor Sarawak', 'Shekwasha', 'Cleopatra', 'Nasnaran' and 'King of Siam', ratios were ≥ 1.5 suggesting that stem development was less affected than root. At the whole plant level, the impact of salinity is primarily sensed in the roots. Usually, genotypes that are characterized by a more developed root system present more developed capacity to explore soil and absorb nutrients from soil which contributes to a better plant performance (Rochdi et al., 2004). 'King of Siam' and 'Anana' were the only accessions that maintained high photosynthetic performance (Fig. 2) associated quite large root development (Fig. 1B) while 'Temple' strongly reduced A even with a high plant development. In the meantime, 'Temple' but also 'Fuzhu' and 'Shekwasha' presented the highest rate of leaf nitrogen content (Fig. 3) associated to low photosynthesis (Fig. 2) suggesting that these accessions limited their metabolism and maintained high nitrogen content to better cope with stress as previously proposed by Brumos et al. (2009).

The inhibitory effect of NaCl on growth results from the disruption of water supply induced by the osmotic effect of salinity (Ruiz et al., 1999). Root is the first place where the adjustment mechanisms and the regulation of growth will be triggered in order to cope stress (Rubinigg et al., 2004). Walker et al. (1982) suggested that the growth decrease, expressed by the decrease of the photosynthetic capacity, can be related to a loss of leaf turgor. ‘Fuzhu’, ‘Willow leaf’, and ‘Beauty’, with strong decrease (> 60%) of photosynthesis (Fig. 2) associated to quite leaf Cl^- accumulation (Fig. 4), presented the lowest leaf osmotic potentials probably to oppose the loss of turgor imposed by salt stress (Fig. 5). However, ‘Nanfen Miguan’ and ‘Bintangor Sarawak’, which presented quite high leaf osmotic potential (~ 2 MPa), showed high leaf Cl^- contents (>20mg/g DW) and probably did not experience extensive osmotic adjustment.

Diversity and salt stress tolerance in mandarins

Among the 4 accessions (‘Ponkan’, ‘Willow leaf’, ‘Beauty’ and ‘Cleopatra’) that were each specific to one genetic group (1, 2, 4 and 5 respectively), only ‘Cleopatra’ presented limited root and leaf Cl^- accumulation and was clearly tolerant to salt stress. On one hand, accessions that were introgressed by the nuclear group 5 (‘Cleopatra’ group) were also low Cl^- accumulators with quite good physiological response to stress and limited leaf chlorosis. On the other hand, accessions only introgressed by groups 1, 3 and 4 usually accumulated high leaf Cl^- contents and were salt sensitive. ‘San Hu Hong Chu’ and ‘Shekwasha’ were introgressed by *Papeda* (13.3 and 18.2 % respectively, Table 1) and group 5, did not accumulate Cl^- and did not present much leaf fall symptoms. Combava (*C. hystrix*), a member of wild *Citrus* species grouped within the subgenus *Papeda*, did not accumulate much Cl^- and was thus considered as tolerant (Hussain et al. 2012). However, ‘King of Siam’ and ‘Nasnaran’ that were also introgressed by *Papeda* (12.5 and 44.7% respectively, Table 1) accumulated the highest rates of leaf and root Cl^- and presented symptoms of leaf fall while remaining leaves were still green. The genetic structure of ‘King of Siam’ and ‘Nasnaran’ is probably much more complex than for the other accessions and may explain the observed physiological traits. It is important to note that ‘Temple’ is a monoembryonic accession, and even though most of fecondations were probably auto fecondations, we may not exclude that pollens of other genitors of the collection could be the parent of the seedlings we investigated and may explain some heterogeneity in the response of the plants to salt stress.

To end, accessions such as ‘Temple’ and ‘Anana’ that we know to have been introgressed by *C. maxima* presented quite good traits of tolerance to salt stress. This is in agreement with previous investigations we performed that showed that pummelos (*C. maxima*) and hybrids are salt stress tolerant (Hussain et al. 2012). Presence of *C. maxima* may then explain in part the salt tolerance of ‘Temple’ and ‘Anana’ accessions.

Mandarin genitors for rootstock and variety breeding programs

Citrus rootstock requirements meanly deal with root Cl^- exclusion. All the accessions introgressed by group 5 presented such traits of tolerance. Among these accessions, ‘Anana’ could be a good parental genitor since it presented similar osmotic potential to ‘Cleopatra’ suggesting good properties for osmotic adjustment. Among accessions that we know to have been introgressed by *Papeda*, ‘San Hu Hong Chu’ presented behavior of tolerance very similar to ‘Cleopatra’ but also showed a limited development. Then, this accession may be interesting to create salt tolerant rootstocks with dwarf phenotype. Regarding varieties, it is much more difficult to present a clear drawing in relation to adaptation. The first researched traits in varieties are related to fruit quality and production, which exclude accessions introgressed, by group 5. ‘Willow leaf’ and in a minor extent ‘Beauty’ are widely used in breeding programs. They are high Cl^- accumulators when investigated as a seedling and can be considered as salt sensitive accessions. However, since these accessions do not experience any limitation of the transfer of Cl^- from root to shoot, one may wonder if these accessions did not develop better properties of tolerance at leaf level such as better compartmentalization or better detoxification processes that would be valuable traits to look for in new varieties. Therefore, studies of salt stress tolerance of a set of selected varieties grafted onto salt sensitive and salt tolerant rootstocks would be required to confirm the potential interest of a variety for salt stress tolerance.

Acknowledgments

Jihene ben Yahmed was supported by a scholarship for doctorate degree from the Government of Tunisia, Ministry of higher education and scientific research of Tunisia.

References

Allario T.; Brumos J.; Colmenero-Flores J-M.; Tadeo F.; Froelicher Y.; Talon M.; Navarro L.; Ollitrault P.; Morillon R. 2011. Large changes in anatomy and physiology between

diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *J. Exp. Bot.* 62: 2507-2519.

Anjum, M.A. 2008. Effect of NaCl concentrations in irrigation water on growth and polyamine metabolism in two citrus rootstocks with different levels of salinity tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*. 30: 43-52.

Arbona, V.; Flors, V.; Jacas, J.; Garcia-Agustin, P.; Gomez-Cadenas, A. 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiology*. 44, 388-394.

Ashraf, M. Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1994, 13, 17-42.

Atmane, R., H. El-Yacoubi and R. Abdellatif. 2003. Responses to NaCl stress of *Citrus aurantium*, Citrange troyer and *Poncirus trifoliata* in callus cultures: assessment of characters for evaluating salt stress responses in citrus rootstocks. *Agronomie*. 23: 643-649.

Bañuls, J. and E. Primo-Millo. 1995. Effect of salinity on some citrus scion-rootstock combinations. *Ann. Bot.* 76: 97-102.

Bañuls J., Serna M. D., Legaz F., Talon M., Primo-Millo E. 1997. Growth and gas exchange parameters of Citrus plants stressed with different salts. *Plant Cell Physiology*. 150: 194-199.

Brumos, J., M. Talón, R. Bouhlal and J. Colmenero Flores 2010. Cl homeostasis in includer and excluder citrus rootstocks: transport mechanisms and identification of candidate genes. *Plant, Cell Env.* 33: 2012-2027.

Brumos, J.; Colmenero-Flores, J. M.; Conesa, A.; Izquierdo, P.; Sanchez, G.; Iglesias, D. J.; Lopez-Climent, M. F.; Gomez-Cadenas, A.; Talon, M. 2009. Membrane transporters and carbon metabolism implicated in chloride homeostasis differentiate salt stress responses in tolerant and sensitive Citrus rootstocks. *Functional & Integrative Genomics*. 9: 293-309.

Byrt, C. S., Munns, R. Living with salinity 2008. *New Phytol.* 179: 903-905.

Cheng Y, De Vicente MC, Meng H, Guo W, Tao N, Deng X. 2005. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in Citrus and related genera. *Tree Physiology* 25: 661–672.

Campbell, C. W. and F. B. Lincoln. 1962. A comparison of rootstocks for Tahiti lime on Rockdale soils in Florida. *Proceeding of the Florida State Horticultural Society* (75): 61-63.

Callister AN, Arndt SK, Adams MA. 2006. Comparison of four methods for measuring osmotic potential of tree leaves. *Physiol. Plant.* 127: 383 -392.

Cooper W.C. and B. S. Gorton. 1952. Toxicity and accumulation of chloride salts in citrus on various rootstocks. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 59: 143-146.

- Cooper** W. C. 1961. Toxicity and accumulation of salts in citrus trees on various rootstocks in Texas. *Proc.of the Florida State Hort. Soc.* 74: 95-104.
- Duan**, X., Liu, T., Zhang, D., Su, X., Lin, H., Jiang, Y. 2011. Effect of pure oxygen atmosphere on antioxidant enzyme and antioxidant activity of harvested litchi fruit during storage. *Food Res. Int.* 44, 1905–1911.
- Froelicher**, Y.; Bassene, J. B.; Jedidi-Neji, E.; Dambier, D.; Morillon, R.; Bernardini, G.; Costantino, G.; Ollitrault, P. 2007. Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Rep.*, 26, 937-944.
- Froelicher** Y., Mouhaya W., Bassene J.B., Costantino G., Kamiri M., Luro F., Morillon R., Ollitrault P. 2011. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genet Gen.* 7: 49-61.
- Garcia-Legaz**, M., J. Ortiz, A. Garc  -Lid  n and A. Cerda 1993. Effect of salinity on growth, ion content and CO₂ assimilation rate in lemon varieties on different rootstocks. *Physiol. Plant.* 89: 427-432.
- Garcia-Lor** A, Luro F, Navarro L, Ollitrault P. 2012. Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity: a perspective for genetic association studies. *Mol. Genet. Genom.* 287: 77-94.
- Garcia-Lor** A., Luro F., Ancillo G., Navarro L., and Ollitrault P. Genetic diversity and population-structure analysis of mandarin germplasm by nuclear (SSR, InDel) and cytoplasmic markers (chloroplastic and mitochondrial). Submitted for publication
- Garcia-Sanchez**, F. and J.P. Syvertsen. 2009. Substrate Type and Salinity Affect Growth Allocation, Tissue Ion Concentrations, and Physiological Responses of Carrizo Citrange Seedlings. *Hortsci.* 44: 1432-1437.
- Gimeno** J., Gadea J., Forment J., Pérez-Valle J., Santiago J., Martínez-Godoy M., Yenush L., Bell  s J., Brum  s J., Colmenero-Flores J., Talón M. and Serrano R. 2009. Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant Mol. Biol.*, 70: 403-420.
- Gmitter** FG Jr., Ollitrault P, Machado M, Reforgiato-Recupero G, Talon M, Roose ML, Navarro L, Wu G, Jaillon O, Morgante M, Rokhsar DS. 2012. Genome sequence analysis and comparisons reveal ancestral hybridization and admixture events in the origins of some citrus cultivars. XII International Citrus Congress- Valencia, Spain. S03O01: 61.
- Gomez-Cadenas** A., Tadeo F. R., Talon M., Primo-Millo E. 1996. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* 112: 401-408.

- Gueta-Dahan** Y., Yaniv Z., Zilinskas B. A., Ben-Hayyim G. 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta*, 203: 460-469.
- Hardy** S. 2004. Growing lemons in Australia- a production manual. Department of Primary Industries. New South Wales, Australia. Available on: [http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/horticulture/citrus/lemon-manual]
- Hamrouni** L., M. Hanana, C. Abdelly, A. Ghorbel. 2010. Exclusion du chlorure et inclusion du sodium : deux mécanismes concomitants de tolérance à la salinité chez la vigne sauvage *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (var. 'Séjène'). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* (15): 387-400
- Hussain** S., Curk F., Dhuique-Mayer C., Urban L., Ollitrault P., Luro F. & Morillon R. 2012. Autotetraploid trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) rootstocks do not impact clementine quality but reduce fruit yields and highly modify rootstock/scion physiology. *Scientia. Hort.* 134: 100-107.
- Iglesias** D. J., Levy Y., Gómez-Cadenas A., Tadeo F. R., Primo-Millo E., Talon M. 2004. Nitrate improvement of growth in salt stressed citrus seedlings through effects on photosynthetic activity and chloride accumulation. *Tree Physiol.* 24: 1027-1034
- Iglesias**, D.; Cercós, M.; Colmenero-Flores, J.; Naranjo, M.; Ríos, G.; Carrera, E.; Ruiz-Rivero, O.; Lliso, I.; Morillon, R.; Tadeo, F. 2007. Physiology of citrus fruiting. *Braz.. J. Plant Physiol.* 2007, 19: 333-362.
- Levy**, J. I., J. K. Hammitt, Y. Yanagisawa, and J. D. Spengler. 1999. Development of a new damage function model for Power plants: Methodology and applications. *Environ. Sci. Technol.* 33: 4364-4372.
- Lopez-Climent**, M.F., V. Arbona, R.M. Perez-Clemente and A. Gomez-Cadenas. 2008. Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Environ. Exp. Bot.* 62: 176-184.
- Maas**, E.V. 1993. Salinity and citriculture. *Tree Physiology.* 12:195-216.
- Mabberley** DJ. 1997. A classification for edible Citrus (Rutaceae). *Telopea* 7: 167-172.
- Meloni** D.A., Oliva M.A., Martinez C.A., Cambraia J. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Env. Exp. Bot.* 49: 69-76.
- Mouhaya**, W., Allario, T., Brumos, J., Andres, F., Froelicher, Y., Luro, F., Talon, M., Ollitrault, P., Morillon, R., 2010. Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings

increases with water availability and correlates with expression of candidate genes. *Func. Plant Biol.* 37: 674-685

Moya, J. L.; Primo-Millo, E.; Talon, M. 1999. Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Plant Cell Environ.* 22: 1425-1433.

Moya JL, Tadeo FR, Gomez-Cadenas A, Primo-Millo E, Talon M. 2002. Transmissible salt tolerance traits identified through reciprocal grafts between sensitive Carrizo and tolerant Cleopatra citrus genotypes. *J. Plant Physiol.* 159: 991–998

Moya, J.L., Gomez-Cadenas, A., E. Primo-Millo and M. Talon. 2003. Chloride tolerance in salt sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water usage, *J. Exp. Bot.* 383: 825-833

Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, Malfa S, Continella G, Tribulato E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1155-1166.

Novillo P, Salvador A, Magalhaes T, Besada C.. Deastringency treatment with co2 induces oxidative stress in persimmon fruit .submitted for publication.

Ollitrault P, Jacquemond C, Dubois C, Luro F. 2003. Citrus. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC (eds). *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Montpellier/Enfield, NH: CIRAD/Science Publishers, Inc., 193-217.

Ollitrault P, Navarro L. 2012. Citrus. In: M Badenes, D Byrne, eds. *Fruit Breeding*. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 623-662.

Perrier X, Jacquemoud-Collet J. 2006. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin> 5.0.158.

Rochdi A., J. Lemsellek, A. Bousarhal, A. Rachidai.2005. Évaluation sous serre de la tolérance à la salinité de quelques porte-greffes d'agrumes : Citrus aurantium et deux hybrides de Poncirus trifoliata (Poncirus x Citrus sinensis et Poncirus x Mandarinier sunki). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9: 65–73

Romero-Aranda,R.; Moya JL., Tadeo FR., Legaz F., Primo-Millo E., Talon M. 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant, Cell Environ.* 21: 1243-1253.

Rubinigg, M., Wenisch, J., Elzenga, J. T. M. and Stulen, I. 2004. NaCl salinity affects lateral root development in Plantago maritima. *Funct. Plant Biol.* 31: 775–780.

- Ruiz**, D., V. Martinez and A. Cerda. 1999. Demarcating specific ion (NaCl, Cl⁻, Na⁺) and osmotic effects in the response of two citrus rootstocks to salinity. *Scientia. Hortic.* 80: 213-224 .
- Saleh**, B., T. Allario, D. Dambier, P. Ollitrault and R. Morillon. 2008. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Comptes Rendus Biologies.* 331: 703-710.
- Storey**, R.; Walker, R. R. 1998. Citrus and salinity. *Scientia. Hortic.* 78: 39-81.
- Swingle**, W.; Reece, P. The botany of Citrus and its relatives. 1967. The citrus industry. Berkeley: University of California 1: 190-430.
- Tanou** G, Job C, Rajjou L, Arc E, Belghzi M, Diamantidis G, Molassiotis A, Job D. 2009. Proteomics reveal the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *Plant J.* 60: 795–804
- Walker**, R.R., Törökfalvy, E. and Downton, W.J.S. 1982. Photosynthetic responses of the Citrus varieties Rangpur lime and Etrog citron to salt treatment. *Aust. J. Plant Physiol.* 9: 783–790.
- Walker**, R. R.; Douglas, T. J. 1983. Effect of salinity level on uptake and distribution of chloride, sodium and potassium-ions in citrus plants. *Aust. J. Agric. Res.*, 34, 145-153.
- Walker**, R.R. 1986. Sodium exclusion and potassium-sodium selectivity in salt-treated trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) and Cleopatra mandarin (*Citrus reticulata*) plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 293–303.
- Xu** Q, Chen L, Ruan X, et al. 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature genetics* 45: 59-66.
- Zekri** M. and L.R. Parsons. 1992. Salinity tolerance of citrus rootstocks: Effect of salt on root and leaf mineral concentrations, *Plant Soil.* 147: 171-181

Tab.1 : List of mandarin accessions related to their genetic parental origin. For each accession is given the common name, the San Giuliano Agronomical Research Station Numbering (SRA), the latin name according to the Tanaka system, the genetic parental origin according to Garcia-Lor et al., (2013), and the seed embryony status (monoembryonic versus poylembryonic).

Mandarin commun name	SRA	Latin name	N1: <i>C. reticulata</i>	N2: <i>C. unshiu</i>	N3: <i>C. deliciosa</i>	N4: <i>C. tangerina</i>	N5 : <i>C. reshni</i> & <i>C.reticulata</i>	Total mandarin	<i>C. maxima</i>	<i>C. medica</i>	<i>Papeda</i>	<i>Fortunella</i>	Nuclear mandarin group, N	Embryony level (Monoembryonic /Polyembryonic)
Ponkan	SRA 584	<i>C. reticulata</i>	94.7%	0.6%	0.8%	2.7%	0.4%	99.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	1	Poly
Willow leaf	SRA 133	<i>C. deliciosa</i>	0.3%	0.3%	98.1%	0.4%	0.3%	99.4%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%	3	Poly
Beauty	SRA 411	<i>C. tangerina</i>	0.3%	0.2%	0.3%	97.1%	1.5%	99.4%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%	4	Poly
Cleopatra	SRA 948	<i>C. reshni</i>	0.4%	0.4%	0.5%	1.2%	96.7%	99.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	5	Poly
													Main nuclear mandarin groups, N (>10 %)	
Dancy	SRA 552	<i>C. tangerina</i>	70.5%	4.1%	10%	18.6%	2.7%	96.9%	0.7%	0.2%	0.5%	1.7%	1,4	Poly
Fuzhu	SRA 775	<i>C. erythrosa</i>	72.3%	4.1%	1.0%	19.1%	2.7%	99.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%		
Nanfen Miguan	SRA 700	<i>C. reticulata</i>	30.7%	32.1%	13.4%	7.6%	9.7%	93.5%	0.5%	0.3%	4.7%	1.0%	1,2,3	Mono
San hu hong chu	SRA 769	<i>C. erythrosa</i>	20.3%	29.0%	8.4%	4.4%	23.3%	85.4%	0.3%	0.2%	13.3%	0.8%	1,2,5, <i>Papeda</i>	Poly
Bintangor Sarawak	SRA 683	<i>Bintangor</i>	15.6%	9.3%	36.7%	26.7%	11.2%	99.5%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%	1,3,4,5	Poly
Vietnam à peau fine	SRA 766	<i>C. kinokuni</i>	19.5%	1.1%	13.3%	31.0%	23.5%	88.4%	0.8%	0.2%	9.7%	0.9%	1,3,4,5	Poly
Temple	SRA 348	<i>C. temple</i>	27.5%	0.9%	0.4%	50.6%	1.3%	80.7%	10.4%	1.0%	7.4%	0.4%	1,4, <i>C. maxima</i>	Mono
Sun Chu Sha	SRA 786	<i>C. reticulata</i>	24.4%	2.6%	5.8%	21.7%	41.5%	96.0%	0.2%	0.3%	1.2%	2.4%	1,4,5	Poly
Shekwasha	SRA 982	<i>C. depressa</i>	17.1%	0.8%	7.3%	3.4%	43.3%	71.9%	1.3%	4.6%	18.2%	4.0%	1,5, <i>Papeda</i>	
Anana	SRA 652	<i>C. reticulata</i>	11.5%	2.1%	17.9%	1.7%	48.7%	81.9%	11.0%	0.4%	5.8%	0.7%	1, 3,5, <i>C. maxima</i>	
King of Siam	SRA 273	<i>C. nobilis</i>	Percentage of contribution of the genome of different parents could not be determined due to interference problems					78.5%	8.4%	0.1%	12.5%	0.5%	Unkown, <i>Papeda</i>	Poly
Nasnaran	SRA 896	<i>C. amblycarpa</i>	4.8%	0.2%	0.5%	17.9%	30.5%	53.9%	0.7%	0.3%	44.7%	0.4%	4,5, <i>Papeda</i>	Poly

Tab.2: Symptoms induced by 11 weeks of salt stress in mandarin accessions.

Mandarin common name	Abbreviation	SRA	Genetic Group	Leaf Fall	Symptoms
Ponkan	Ponk	584	1	++	Leaf curling Apical leaf yellowing Blight spots on leaf tips
Fuzhu	Fuzh	775		+++	Slight leaf curling (similar to Ponkan) Slight leaf chlorosis Leaf fall of the apical parts of the plant
Dancy	Danc	552		+	Leaf yellowing from apical borders but veins remained green Blight spots on leaf tips
Nanfen Miguan	NaMi	700	2	+	Yellowing of apical leaves from the extremity
San Hu Hong Chu	SHHC	769			Slight yellowing of young leaves at the tips Slight curling of the leaves
Willow leaf	WilLe	133	3	+++	Strong leaf yellowing Leaf fall
Bintangor Sarawak	BiSa	683		+	Yellowing of apical leaves but veins remained green Blight spots on leaf tips
Beauty	Beau	411	4	++++	Defoliation of the apical part of the plant Leaf yellowing
Temple	Temp	348		++++	Yellowing and burning of the leaf extremities
Vietnam à peau fine	Viet	766		+	Leaf yellowing , veins remain green Slight leaf curling
Cleopatra	Cleo	948	5	+	Slight yellowing of apical leaves but veins remained green Slight leaf curling (similar to Fuzhu and Vietnam)
Anana	Anan	652		+	Yellow spots in the center of leaves Blight spots of leaf tips
Shekwasha	Shek	982		+	Slight yellowing of the apical leaves Slight leaf curling (similar to Fuzhu)
Sun Chu Sha	SuCS	786		++	Yellowing of leaf borders Blight spots on leaf borders
King of Siam	KiOS	273	?	+++	Leaf yellowing and circular blight spots in the center of the leaves
Nasnaran	Nasn	896	?	++	Leaf vein yellowing Drying of leaves

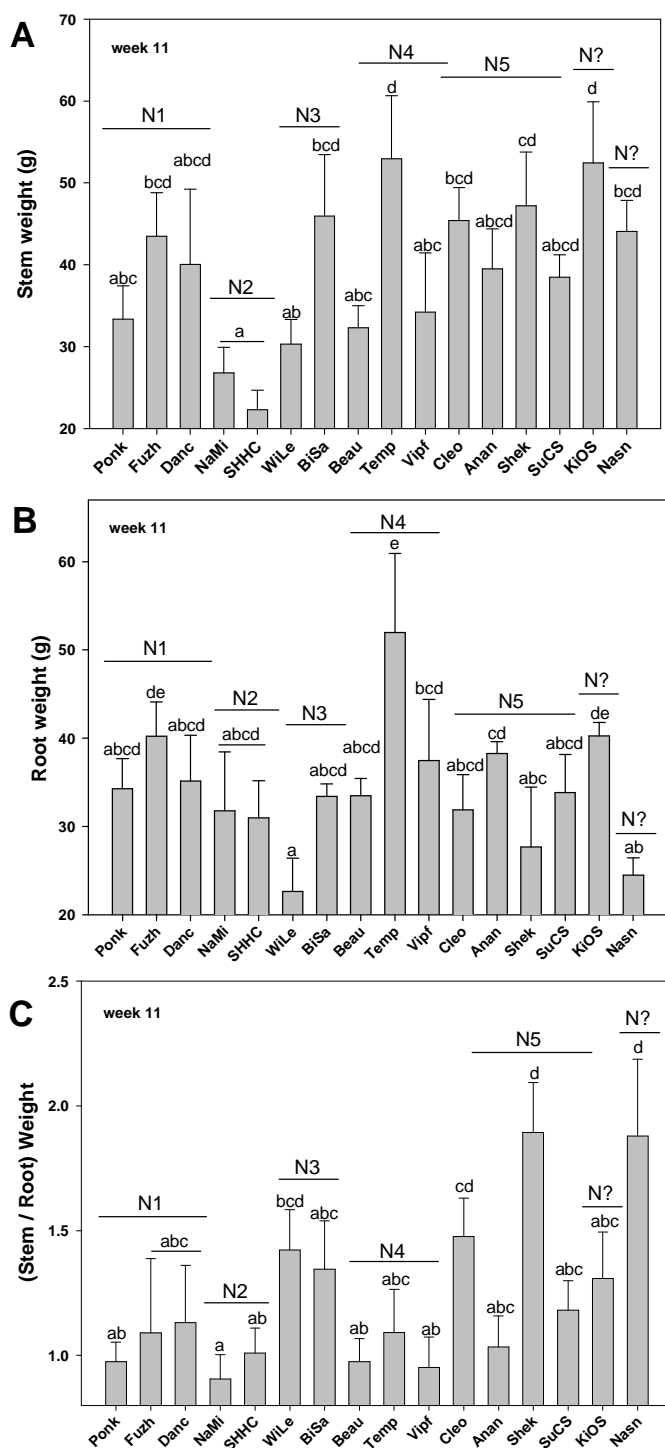


Fig.1: Growth of the 16 mandarin accessions subjected to 11 weeks of salt stress. A) Stem weight, B) Root weight and C) (Stem/Root) weight ratio. Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P < 0.05$, $n \geq 3$).

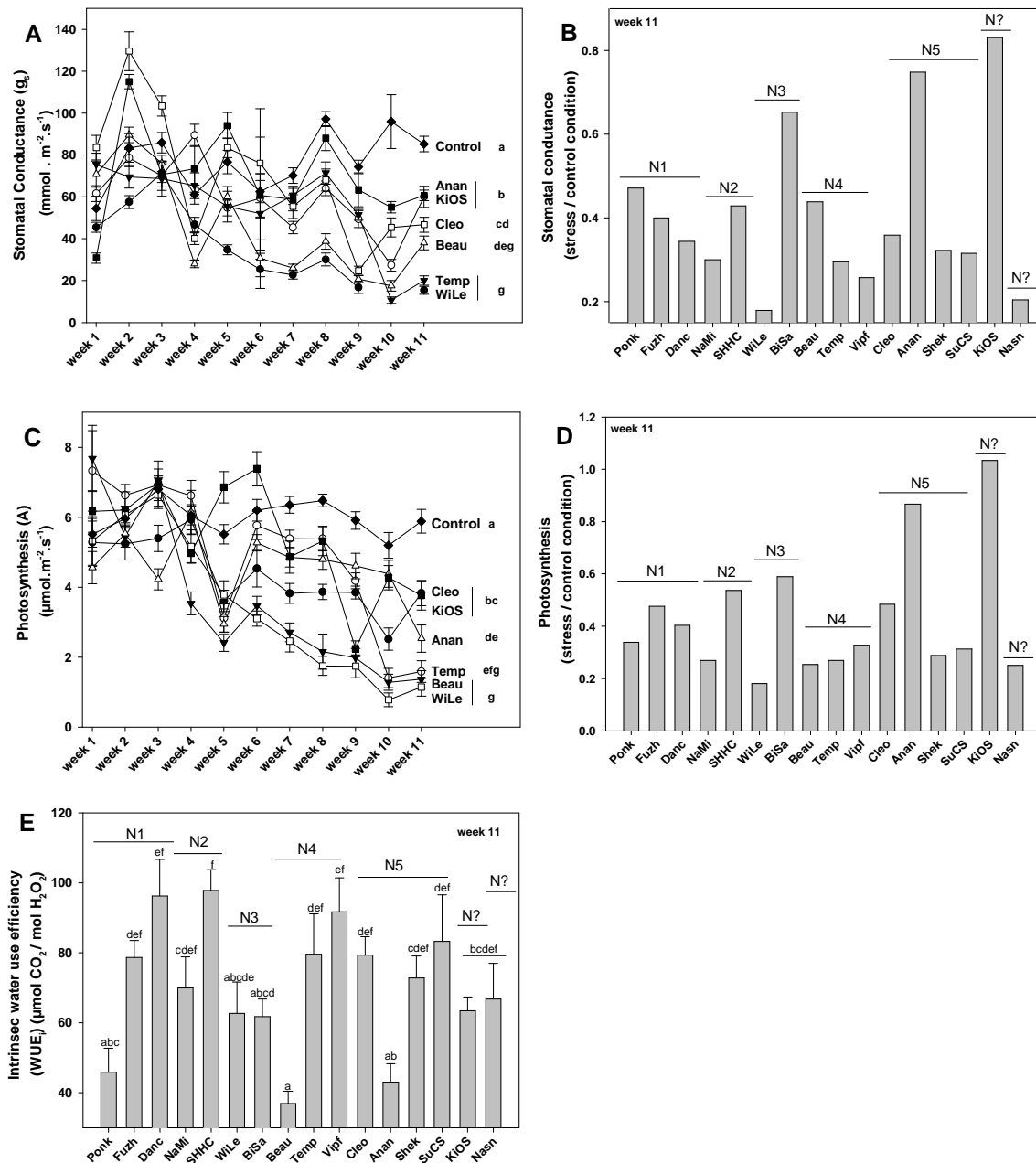


Fig.2: Physiological response of the 16 mandarin accessions subjected to 11 weeks of salt stress. A) Stomatal conductance (g_s) of six representative accessions along 11 weeks of salt stress. For each date, control represents the mean value for the 16 accessions. B) g_s based on the ratio of g_s after 11 weeks of salt stress over g_s in control conditions for each of the 16 accessions. C) Net photosynthesis (A) of six representative accessions. For each date, the control represents the mean value for the 16 mandarin accessions. D) A based on ratio of A after 11 weeks of salt stress over A in control condition for each of the 16 accessions. E) WUE_i ($=A/g_s$) measured after 11 weeks of salt stress for the 16 mandarin accessions. Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P \leq 0.05$, $n \geq 15$).

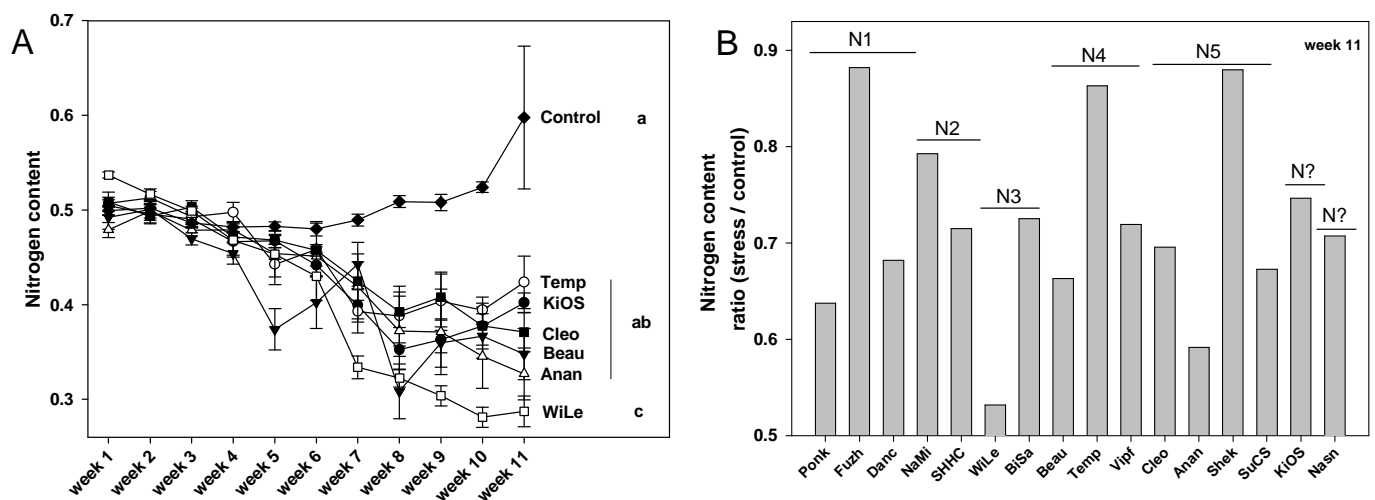


Fig.3: Leaf nitrogen content the 16 mandarin accessions subjected to 11 weeks of salt stress. A) Estimation of nitrogen content of seven representative accessions along 11 weeks of salt stress. For each date, the control represents the mean value for the 16 accessions. B) Nitrogen content based on the ratio of stress value measured after 11 weeks of salt stress over nitrogen content in control conditions for the 16 genotypes. Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P \leq 0.05$, $n \geq 15$).

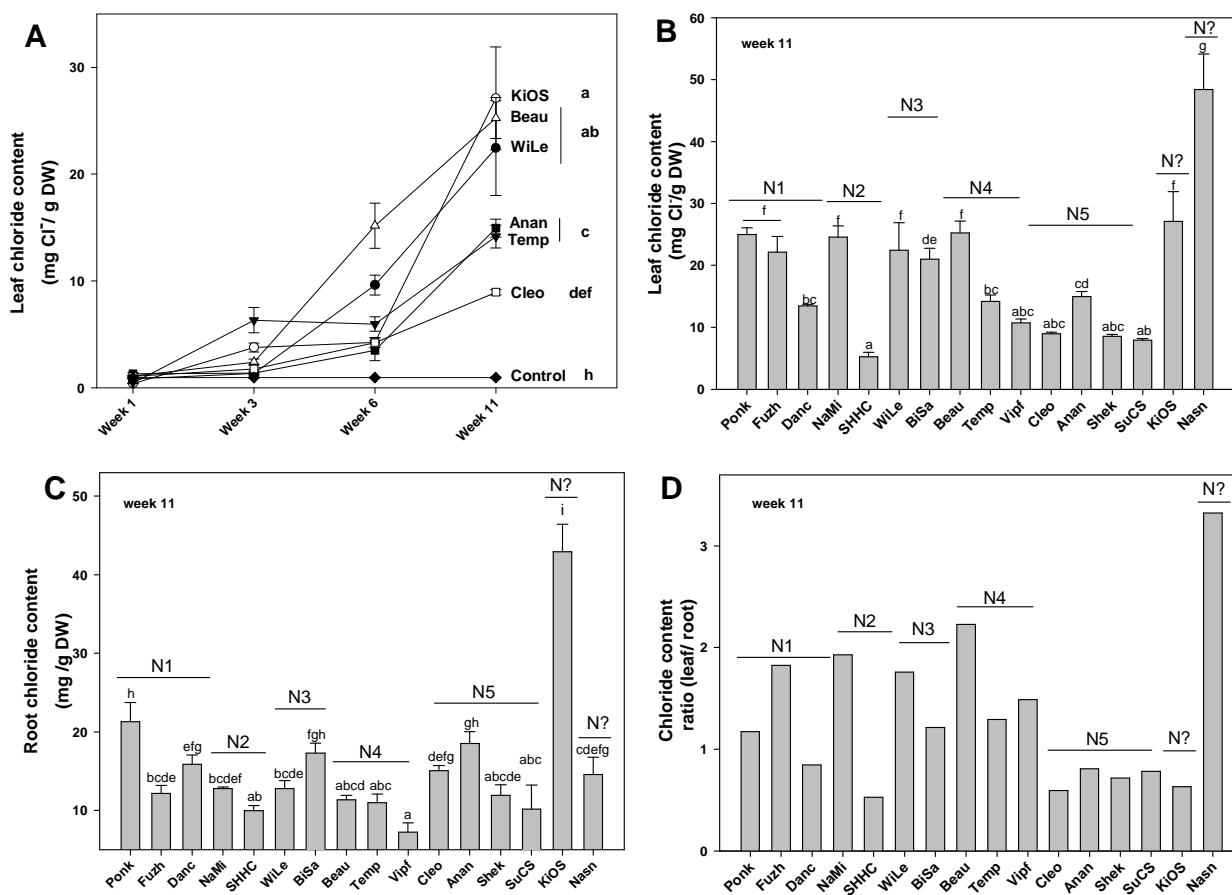


Fig.4: Leaf and root chloride contents for the 16 mandarin accessions subjected to 11 weeks of salt stress. A) Leaf chloride contents of six representative accessions along 11 weeks of salt stress. For each date, control represents the mean value of the 16 accessions. B) Leaf chloride content at the end of the experiment. C) Root chloride content at the end of the experiment. D) Chloride contents based on the ratio of the leaf chloride content after 11 weeks of salt stress over the root chloride content measured after 11 weeks of salt stress. Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P \leq 0.05$, $n \geq 3$).

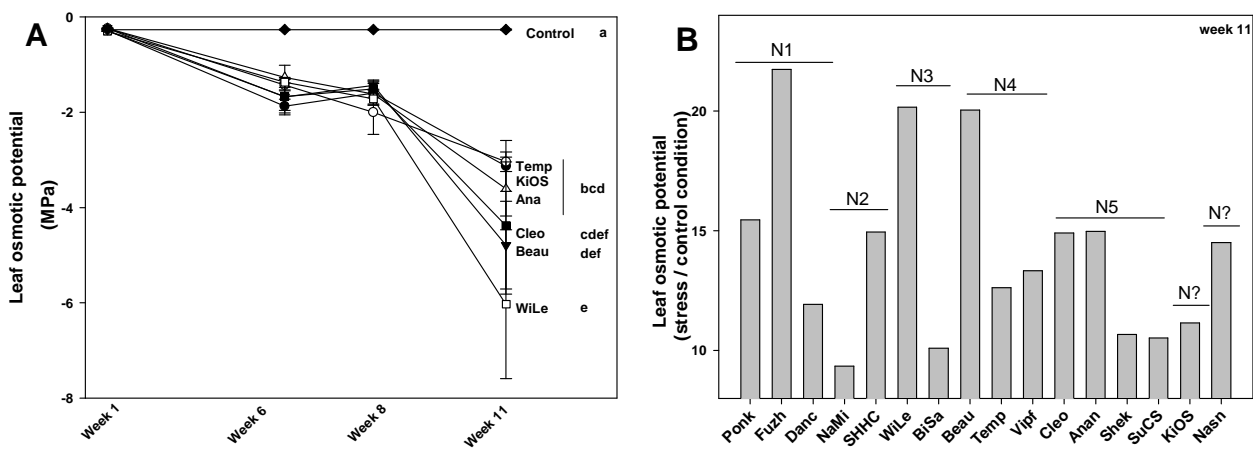


Fig.5: Leaf osmotic potential for the 16 mandarin accessions subjected to 11 weeks of salt stress. A) Leaf osmotic potential of seven representative genotypes B) Leaf osmotic potential based on the ratio of the leaf osmotic potential after 11 weeks of salt stress over leaf osmotic potential measured in the control condition. Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P \leq 0.05$, $n \geq 5$).

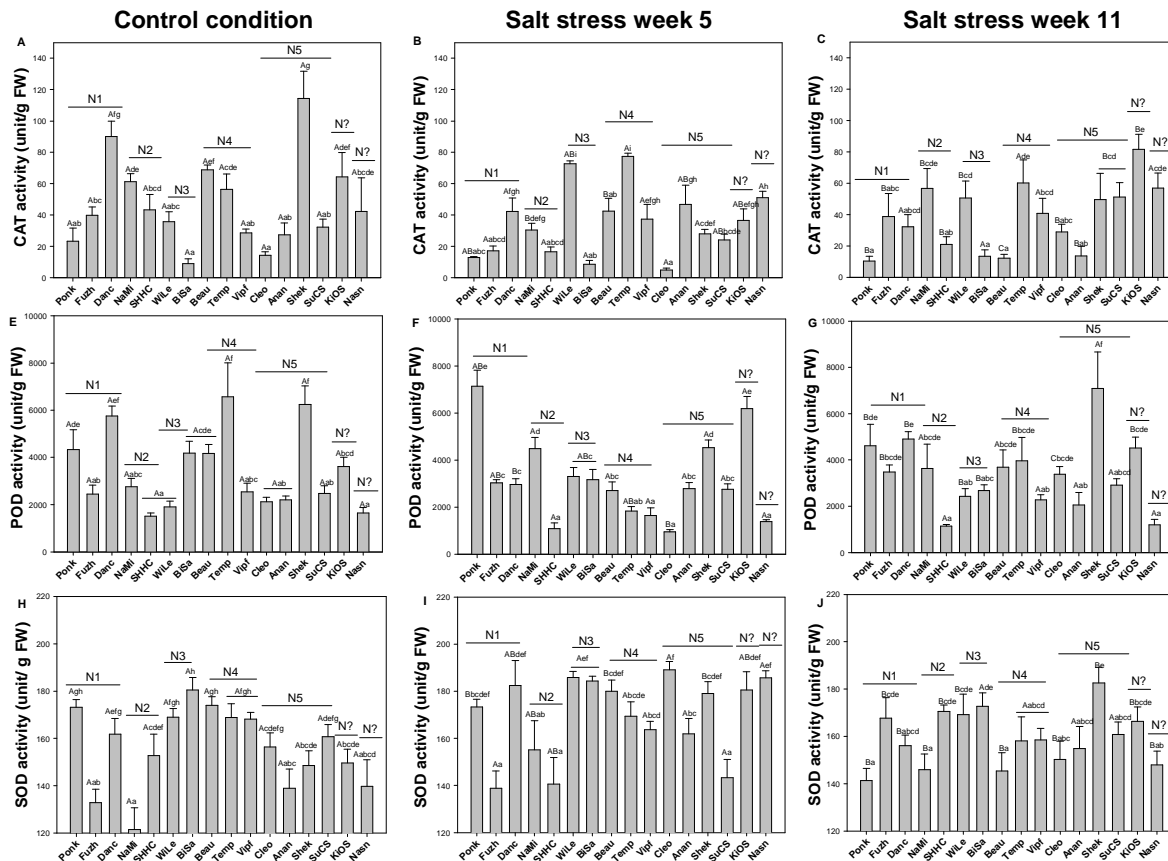


Fig. 6. : Antioxidant enzyme specific activities (CAT (A, B, C), POD (D, E, F) and SOD (H, I, J)) in leaves of the 16 mandarin accessions in control condition and after respectively 5 and 11 weeks of salt stress. All data are presented as mean values (\pm S.E). Different upper case letters indicate significant differences between genotypes at a specific date and different lower case letters indicate significant differences along the time course for one accession ($P \leq 0.05$, $n = 6$).

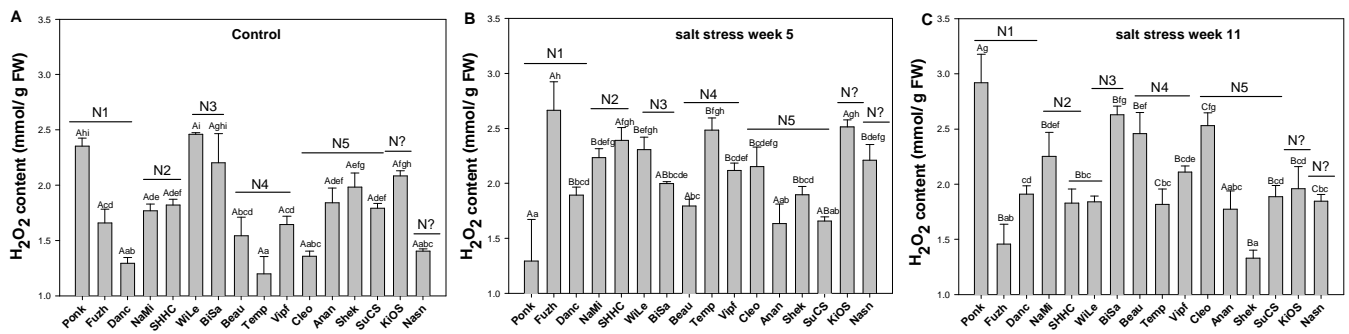
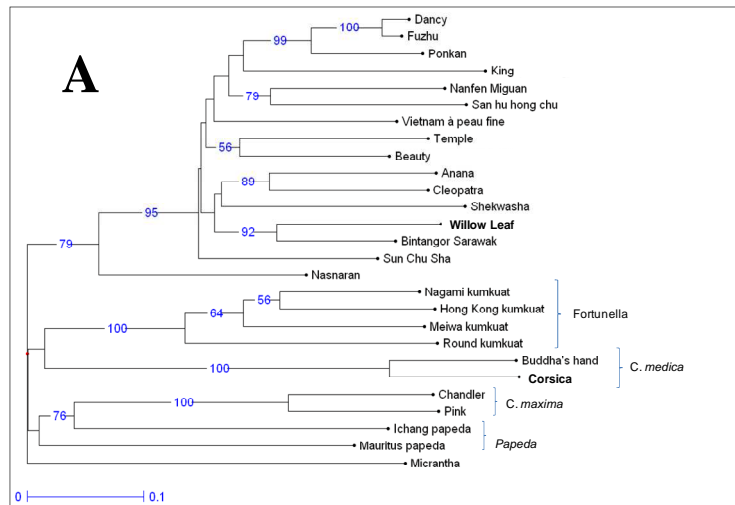
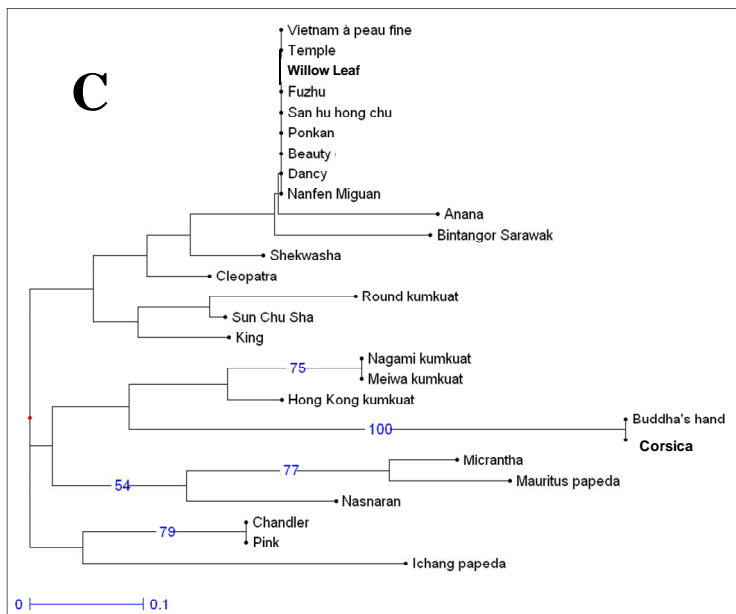
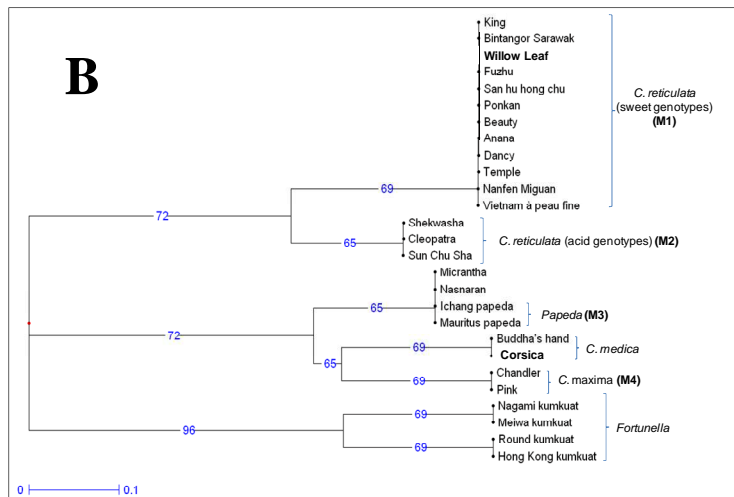
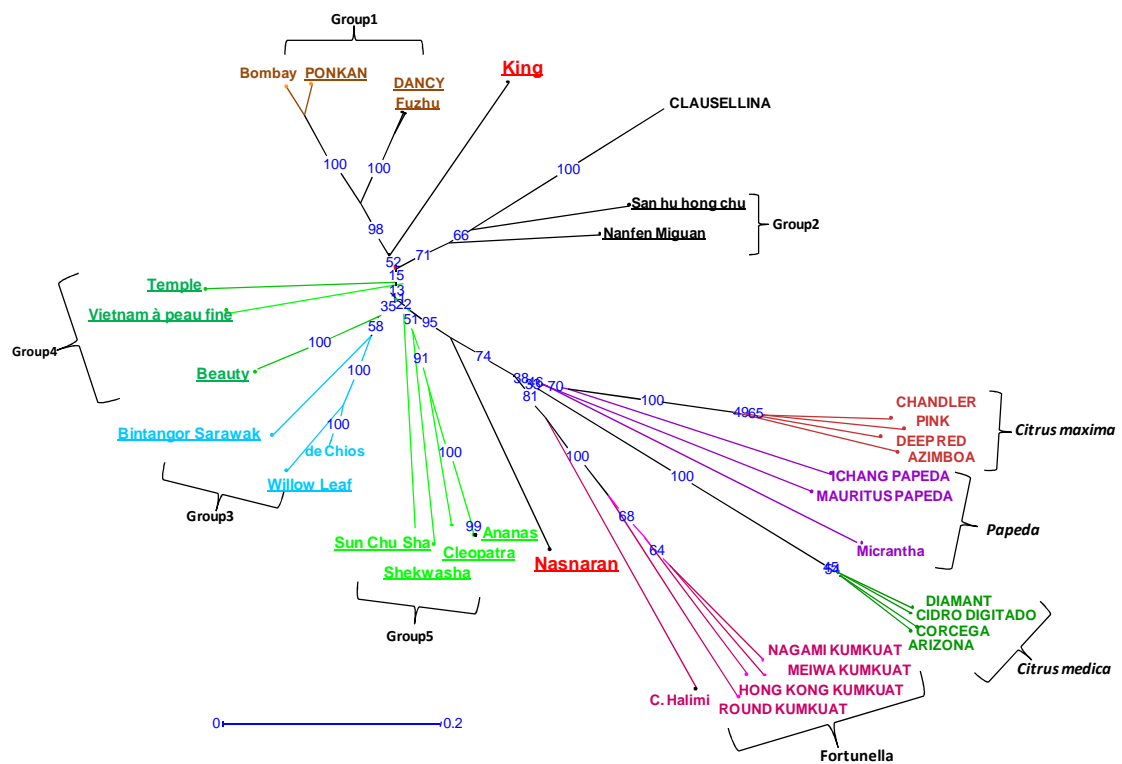


Fig.7: Leaf hydrogen peroxide (H_2O_2) content. H_2O_2 content in leaves of 16 mandarins accessions in control condition (A) and after respectively 5 (B) and 11 (C) weeks of salt stress. All data are presented as mean values (\pm S.E). Different upper case letters indicate significant differences between accessions at a specific date and different lower case letters indicate significant differences along the time course for one accession ($P \leq 0.05$, $n = 6$). Numbers in brackets represent the mandarin nuclear genetic groups.



Sup Fig. 1: Nuclear (A), mitochondrial (B) and chloroplast (C) diversity of the investigated mandarins as well as representatives of other ancestral taxa (*C. maxima*, *C. medica*, *Papeda*, *Fortunella*) according to the data presented in Garcia-Lor et al. (2013). MX: mitochondrial groups





Sup Fig.2: Genetic conformity of mandarins seedlings investigated for salt tolerance according to Garcia-Lor et al., (2013). Group X : nuclear level (SSR and indel marker data). Genotypes underlined correspond to the genotypes used for the study of behavior under salt stress

Chapitre 3

**Etude des propriétés de tolérance au stress salin de
rameaux isolés de mandariniers : une nouvelle
methode pour caractériser la tolérance au sel des
variétés**

Résumé :

L'adaptation au stress salin résulte d'une interaction de plusieurs mécanismes situés au niveau racinaire mais également au niveau de la partie aérienne. Chez les agrumes l'utilisation de porte-greffes permet de limiter la translocation d'ions toxiques de la racine vers les parties aériennes et permet donc de conférer une meilleure adaptation à ce stress.

L'étude que nous avons réalisée précédemment (chapitre 2) a permis de mettre en évidence une large gamme de tolérance au sel au sein du groupe des mandariniers. Si les accessions appartenant au groupe des mandariniers acides se sont révélés être tolérantes, certaines variétés douces présentaient également des traits de tolérance, bien qu'elles aient pu présenter des teneurs en Cl^- élevées dans les feuilles. Nous nous sommes donc posés la question de savoir si la tolérance de ces accessions n'était pas liée à des propriétés de tolérance spécifiques au niveau des feuilles permettant de s'affranchir de la présence des ions toxiques.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux propriétés de tolérance au stress salin de rameaux isolés mandariniers soumis à un stress salin. L'expérimentation a consisté à prélever de rameaux afin de leur faire subir un stress salin (50 mM) pendant une semaine. Préalablement, les rameaux ont été recoupés dans la solution afin d'éviter les phénomènes d'embolie. Cette technique nous a permis de comparer le comportement des rameaux isolés de 16 accessions de mandariniers par rapport aux plants francs de pied. Bien qu'artificielle, cette méthode nous a permis d'étudier les propriétés de tolérance au stress salin des différences accessions en s'affranchissant du compartiment racinaire. En effet, dans les conditions expérimentales choisies, il n'y a pas de limitation du transport des ions Cl^- et Na^+ vers les feuilles.

Les paramètres physiologiques tels que les échanges gazeux, pression osmotique foliaire, teneur en chlorure des feuilles et des racines ont été analysés. Des échantillons de feuilles ont été également récoltés afin de mesurer les teneurs en H_2O_2 mais également pour mesurer l'activité d'enzymes impliquées dans la synthèse d'espèces actives de l'oxygène ou dans les processus de détoxification.

Les résultats que nous avons obtenu montrent que les accessions qui accumulent des ions Cl^- lorsque les plants sont francs de pied (et qui sont donc le plus souvent sensibles), présentent une moindre sensibilité dans le cas de l'étude réalisée à partir de rameaux isolés. Au contraire les accessions présentant une exclusion racinaire importante des ions Cl^- lorsqu'étudiées franc de pied, comme par exemple le mandarinier 'Cléopâtre', sont très sensibles dans l'étude réalisée sur rameaux isolés. Nos résultats suggèrent que les systèmes antioxydants restent

opérationnels même en absence de racines. De même, une meilleure compartimentation intracellulaire des ions toxiques au niveau des feuilles pourraient expliquer la meilleure tolérance d'accessions comme le mandarinier 'Willow leaf' malgré une accumulation importante de Cl^- et Na^+ dans les feuille. Cette technique rapide semble montrer qu'il est possible de caractériser les propriétés de tolérance au stress salin d'une variété en s'affranchissant du compartiment racinaire. Cette méthode pourrait donc être intéressante, par exemple, pour la sélection de nouvelles variétés triploïdes présentant des fruits aspermes de qualité mais également présentant de traits de tolérance au stress salin.

Article 3

A simple and fast method to investigate salt stress tolerance of citrus varieties

Jihène Ben Yahmed^{1,2}; Pedro Novillo²; Anna Quinones², Maria-Angeles Forner², Alexandra Salvador²; Mehdi Ben Mimoun³; Manuel Talon²; Patrick Ollitrault^{1,2}; Raphaël Morillon^{1,2*}

¹CIRAD, UMR AGAP, Avenue Agropolis - TA A-75/02 – 34398 Montpellier cedex 5, France

²IVIA, Ctra. Moncada-Náquera Km 5, 46113 Moncada, Valencia, Spain

³INAT, 43, Avenue Charles Nicolle 1082 –Tunis - Mahrajène Tunisia

***Corresponding author:** Raphaël Morillon, CIRAD, UMR AGAP, Avenue Agropolis - TA A-75/02 – 34398 Montpellier cedex 5, France

Number of table: 1; Number of Figures: 7

Number of supp. table: 1; Number of Supp. Figure: 1

Abstract

Mandarin is an important genetic group in citrus that is used in breeding programs to confer very good fruit quality properties to varieties but also abiotic stress tolerance traits to rootstocks. Usually, scion tolerance to salt is not directly evaluated since it is grafted onto a rootstock that limits toxic ion translocation. In the present work, we propose a simple and fast method to investigate salt stress tolerance traits of the scion. Twigs of 16 mandarin accessions that we previously analyzed as seedling for their properties of tolerance to salt stress were cut under saline solution to prevent embolism and were kept for one week in solution. Physiological parameters such as gas exchanges, volume of solution absorbed, osmotic pressure, leaf Cl^- and Na^+ contents were analyzed. Samples were also harvested to characterize the presence of H_2O_2 as well as the activity of enzymes involved in synthesis of ROS and detoxification processes. Very contrasted behaviors were noted. Classic cultivars such as *Citrus reshni* Hort. ex Tan. ('Cleopatra') presented quickly wilting phenotype that was associated to limited translocation of Cl^- from the solution to the shoot. However, 'Willow leaf' mandarin that we previously showed to be salt sensitive when investigated as a seedling, presented limited symptoms of wilting and accumulated much more Cl^- in leaves of the twig than 'Cleopatra'. Our results suggest that twigs from tolerant accessions, when

placed in a saline solution, may have developed specific mechanisms in leaves to cope with high toxic ion contents. This simple method allows to set aside the root compartment, where ions exclusion mechanisms may exist, when investigating seedlings. Then, we believe it is possible to quickly evaluate scions from citrus varieties that may present specific traits of salt tolerance.

Key words: citrus, mandarin, salt stress, varieties

Introduction

Soil salinity is a major environmental factor affecting citrus growth and productivity. In grafted trees, adaptation to abiotic stress such as salt stress is the result of the interaction between mechanisms located at the root system but also in the aerial part. The interest to use a rootstock is because it confers traits of tolerance to biotic and abiotic stress. In citrus, the *Poncirus* genus, confers tolerance to Citrus Tristeza Virus (CTV) but it is very sensitive to salt stress (Brian and Revelant, 1992; Castle et al., 1993; Ferguson et al., 1990). Cleopatra mandarin is one of the most tolerant rootstocks used in the citrus industry (Wutscher, 1979). However, it is susceptible to CTV which limits nowadays its use. Then, this accession is widely used in rootstock breeding programs in association with *Poncirus* accessions to cumulate biotic and abiotic traits of tolerance. In citrus, damages caused by salinity are usually associated with Cl^- accumulation but not with Na^+ (Banuls et al., 1997; Moya et al., 2003, Hussain et al., 2012). *Poncirus* accessions are considered as poor Cl^- excluders (Cooper, 1961) although they have a great capacity to exclude Na^+ at low salinity levels (Walker, 1983) which explain in part the salt-sensitive nature of this rootstock (Cooper et al., 1952; Zekri and Parsons, 1992). According to Moya et al. (2003), if Cl^- absorption is not limited at the root level, ions will be translocated to the leaves via the transpiration stream and they will cause necrosis and even defoliation. When using Carrizo citrange rootstock, which is a hybrid (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), Cl^- translocation is observed in leaves of the seedling (Romero-Aranda and al., 1998) but also in the leaves of varieties that may be grafted on it (Walker and al., 1983). Accumulation of Cl^- and Na^+ ions to toxic levels are associated with a decrease of the osmotic potential, and nutritional imbalances (Byrt and Munns, 2008) leading to a reduction of plant growth and fruit yields (Storey and Walker, 1998). After stomata closing and a consecutive limitation of photosynthesis, plants regulate their osmotic potential which involves several processes such as K^+ uptake,

compartmentalization of toxic ion outside of the cytoplasm and synthesis of compatible solutes (Ashraf, 1994). A secondary effect of toxic ions along with salt stress (Gómez-Cadenas et al., 1996) is the triggering of oxidative stress (Gueta-Dahan, 1997, Tanou et al, 2009), which causes damage to the leaf photosynthetic machinery.

Mandarins play an important role in the evolution of cultivars of the genus *Citrus*. Recently Garcia-Lor et al. (2013) identified five main groups of ancestral mandarin among 223 accession mandarins by using SSRs and InDel markers : 1) *C. reticulata*, 2) *C. deliciosa*, 3) *C. tangerine*, 4) *C. unshiu*, 5) small mandarin), and two hybrid groups (Ampefy, Wallent, Gailang groups and tangors group 'King'). The other identified ancestors included *C. maxima* (pummelo), *C. medica* (lemon) and *C. mircrantha* Wester (*Papeda*). For an agronomical point of view, mandarins can be roughly clustered in two main groups: the acidic group that gathers accessions used as rootstocks, such as 'Cleopatra' and 'Sunki' mandarins, and sweet mandarins group that gathers varieties commercialized for the fresh market. By investigating 16 different mandarin seedling accessions when subjected to salt stress, we confirmed that the acidic accessions are usually more tolerant to salt stress (Ben Yahmed et al., submitted for publication). In mandarin varieties used to produce fruit, little is known regarding their tolerance to salt stress independently of the capacity of the root compartment to limit the translocation of toxic ions from root to shoot. Indeed, we observed that among the seedlings of sweet mandarin accessions we studied, some were also quite tolerant even though they accumulated high Cl^- contents. So, accessions that may be poor root Cl^- excluder, when investigated as seedlings, may have developed at leaf level better efficient mechanisms to cope with the presence of toxic ions. On the contrary, accessions that exclude Cl^- at root level and then rarely deal with high Cl^- content at leaf level may have not developed such mechanisms. In order to characterize the salt tolerance potential of the aerial part in different mandarin accessions, we used a simple method which consists to plunge twigs in a saline solution for one week. According to the 'cohesion tension theory' (Boehm, 1893; Dixon and Joly, 1894; Richter, 1972; Jackson and Grace, 1994), water transport system in plants is based on water columns transmitting negative pressure to xylem vessels and finally to the soil. Air spaces, that may be present in the xylem can destabilize the water columns and consequently induce a breakage of the hydrogen bonds between water molecules, leading to embolism (Tyree et al., 1994). In order to maintain the water column as well as gas exchanges along the experiment without inducing embolism, twigs were cut in solution. This simple method allowed 1) to set aside of the root compartment where ions exclusion mechanisms may exist when using seedlings, 2) favor a fast absorption of ions in the

transpiration stream through the xylem vessels and 3) get a prompt response regarding the phenotype induced at leaf level in different mandarin accessions we investigated.

Materials and methods

Plan material and salt stress application

Experiments were carried out on 16 two years old mandarins accessions (Table 1) grown in greenhouse condition (Ben Yahmed et al., submitted for publication). Nine twigs (50 to 60 cm) of nine independent plants of each genotype (a total of 144 twigs) were used. For each accession, twigs presented similar number of leaves and consequently similar leaf area. In the greenhouse, extremities of the twigs were cut a second time (1 cm from the tip) under solution and placed in 50 ml glass test tubes (2.5 cm diameter). These tubes were then kept sealed around the twig with parafilm to reduce evaporation of water. Tubes with twigs were maintained in greenhouse condition for one week under natural photoperiod conditions, with day/night temperatures of 25–32 °C/18–22 °C, respectively, and relative humidity varying between 60 and 85%. Three twigs of each accession were assigned as controls (water) and the six were assigned to undergo a 50 mM salt stress. Initial volume of solution in tube was equal to 50 ml. Marks were done with a pen on tubes to measure the volume of solution that was absorbed. Measurements of the consumed water were performed daily until the end of the experiment. When required, solution was added for control tubes to maintain the level.

Gas exchange measurements

Net photosynthesis rate (A) and stomatal conductance (g_s) measurements were performed according to Ben Yahmed and al. (submitted for publication) using an Infra Red Gas Analyser (ADC, LCPpro) at a definite light intensity ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), in the morning (8 to 11 AM) to avoid high external temperatures and low humidity. Leaf temperature was $26 \pm 2^\circ\text{C}$, leaf to air vapor pressure difference was $2.4 \pm 0.4 \text{ kPa}$. Measurements were made the first day (24 hours after installing twigs in saline solution), 2nd, 3th and 7th day. Samples for enzymatic assays, leaf Cl^- , Na^+ and other macro and micro elements contents were collected at the last day of the experiment.

Leaf chloride and sodium contents, leaf osmotic potential and leaf area

Leaf chloride content was measured according to Iglesias et al. (2004). Leaf sodium content was estimated according to Quinones et al. (2013). Leaf osmotic pressure was measured according to Martre et al. (2002). The osmolality of the expressed liquid was

measured with a vapor pressure osmometer (5500 Vapro, Wescor, Logan, UT) and used in the Van't Hoff relation to calculate the osmotic pressure (Megapascals). To estimate the total leaf area of twigs, 30 leaves of each accession were collected and scanned. The leaf area was measured using the ImageJ software. Number of leaves of the twigs of each accession we evaluated in salt stress condition was counted. Total leaf area was estimated by multiplying the number of leaves by the mean surface area of each accession.

Assay of detoxification enzymes and EOA

Enzymes extraction and assays

CAT and POD assays

For the CAT and POD assays, extractions are performed according to Ben Yahmed et al. (submitted for publication). 0.5 g of frozen leaves at -80 °C are grounded in liquid nitrogen using a mortar. For each sample is added 0.05 of PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone) and 10 ml of extraction solution 0.05 M, pH = 7 consists of 39% of NaH_2PO_4 and 61% of Na_2HPO_4 containing 1 mM EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid) and 2 mM DTT (Dithiothreitol). Thereafter, the contents are homogenized with Ultra-Turrax vortex and then centrifuged at 12,000 rpm for 25 min at 4°C. The measurements are performed on the supernatant using a spectrometer at 240 nm for the catalase and 470 nm for the peroxidase.

SOD assay

SOD (Superoxide activity Dimustase) was assayed according to Ben Yahmed al. (2013). This SOD method is based on the superoxide-dependent reduction of nitroblue tetrazolium (NBT). The method chosen to generate superoxide radical is the enzymatic oxidization of xanthine to uric acid by xanthine oxidase (Sigma-Aldrich). SOD activity is determined by the degree of inhibition of a basal rate of superoxide production and NBT reduction, which is followed by reading absorbance at 560 nm. One unit of SOD was defined as the amount of enzyme that causes 50% inhibition of the aforementioned reaction in comparison with the blank sample. 0.5 g of frozen leaves are ground and put into tube with 0.05 g PVPP and 5 ml of 0.05 M extraction solution (pH = 7.8 containing 8.5% NaH_2PO_4 , 91.5% of Na_2HPO_4 and 1.33 mM DATAPAC). The supernatant is filtered and the measurements are made at 590 nm.

Measurement of H₂O₂ content

H₂O₂ content was measured according to the protocol used by Ben Yahmed and al. (2013). 0.5 g of frozen plant material are grounded and homogenized with 2.5 ml of TCA and centrifuged for 12,000 rpm at 4°C for 15 min. The entire solution is filtered. To 0.5 ml of the filtrate, 0.5 ml of buffer and 1 ml of potassium iodide are added. Measurements of the optical density were established at 390 nm. The rate of H₂O₂ will be estimated using a standard curve established in the same way.

Statistical analyses

Data are expressed as means \pm SE and were analysed with SIGMASTAT (SPSS, Chicago; www.spss.com_software_science). An ANOVA was used to detect differences between mandarins. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

The response of the aerial part of 16 mandarin accessions was evaluated when subjected to salt stress. Homogeneous twigs with similar leaf numbers of each mandarin accession (Table 1) were selected and cut. Twig extremities were then plunged in solutions (water and 50 mM NaCl solution for control and salt stress respectively). Prior to be dragged in a 50 mL glass tube, a second section at 1cm of the extremity in the solution was recut with a pruning shears to limit xylem embolism. The impact of the salt stress on twigs was evaluated for seven days. On figure 1A & C is presented a picture illustration of ‘Cleopatra’ and ‘Willow leaf’ mandarin twigs after seven days in water. Leaves remained turgid with a maintaining of stable and quite high values of stomatal conductance and photosynthesis (Fig. 2A & C). The total leaf surface areas of twigs (Supp. Fig 1) were also estimated as well as the quantity of transpired water by leaf area (Fig. 2E & F). Interestingly, some accession such as ‘Cleopatra’, ‘Willow leaf’ and ‘Nasnaran’ presented water consuming more than twice higher than other accessions such as ‘Ponkan’, members of the N4 group and most representatives of the N5 group (Fig. 2F). When subjected to salt stress, a wilting phenotype was observed after seven days for several accessions (Table 1). On the pictures of figure 1 are presented an illustration of the phenotype observed for ‘Willow leaf’ and ‘Cleopatra’ accessions. Unexpectedly, leaves of ‘Willow leaf’ remained turgid while twigs and leaves of ‘Cleopatra’ were strongly wilted (Fig. 1 B and D respectively). For all accessions except ‘Vietnam’, g_s values decreased to a value below 0.02

mol m⁻² s⁻¹ after seven days of stress. Decrease of photosynthesis was not so important depending of the accessions. ‘San Hu Hong Chu’, members of N3 group, ‘Vietnam’, ‘Sun Chu Sha’ and ‘King of Siam’ presented values from 1.5 to 2.5 μmol.m².s while values of ‘Ponkan’, ‘Fuzhu’, ‘Nanfen Miguan’, ‘Temple’, ‘Cleopatra’, ‘Anana’ and ‘Shekwasha’ were below 1. Water consumption per leaf area along the seven days of stress was much lower than for control accessions, ‘Willow leaf’ and ‘Nasnaran’ being the accessions presenting the highest values (Fig. 2 F). Cl⁻ and Na⁺ leaf contents were also measured the 7th day (Fig. 3). ‘Willow leaf’ and ‘Nasnaran’ were the accessions with the highest rate of leaf Cl⁻ and Na⁺ contents with values higher than 20 mg /g DW and 5 mg /g DW respectively. Other accessions presented values below 15 mg /g DW and 4 mg /g DW for leaf Cl⁻ and Na⁺ respectively. Macro and micro elements were also analyzed in leaves (supplemental Table 1). High levels of boron (B), iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), calcium (Ca) were measured in ‘Willow Leaf’, ‘Beauty’ and ‘Ponkan’ on the contrary to ‘King of Siam’ and ‘Sarawak’ that presented contents two to three times lower. Regarding macro elements, much higher leaf content of phosphorus (P) were measured in ‘Willow Leaf’ and ‘Nasnaran’ compared to other accessions. Estimation of the leaf osmotic potential showed that ‘Dancy’, ‘Sun Chu Sha’ and ‘Bintangor Sarawak’ were the accessions that presented the more limited changes of osmotic potential (ranged from -1.2 to -1.8 MPa) while other accessions presented much lower values (-2.4 to -2.8 MPa) (Fig.4).

CAT, POD and SOD antioxidant enzyme activities were measured the 7th day of the experiment (Fig. 5). ‘Nasnaran’ presented the strongest CAT activity (140 CAT unit/g FW) while values of members of N5 group were quite low (below 40 CAT unit/g FW). Other accessions from group 2 to 4 presented intermediate CAT activity ranging from 60 to 100 CAT unit/g FW (Fig. 5A). ‘San Hu Hong Chu’, N3 group, ‘King of Siam’ and ‘Nasnaran’ presented the lowest POD activity (around 2000 POD unit/g FW) while group 1 and 4 presented values ranging from 3000 to 5000 POD unit/g FW (Fig. 5B). SOD activity changes ranged from 300 to 360 SOD unit/g FW (Fig. 4C). Leaf H₂O₂ content was also estimated and ranged from 2 to 2.5 mmol/g FW for most accessions except for ‘Bintangor Sarawak’, ‘San Hu Hong Chu’, ‘Sun Chu Sha’ and ‘Nasnaran’ that presented higher (>3 mmol/g FW) and lower (~ 1.5 mmol/g FW) contents respectively (Fig. 5).

Discussion

Air embolism in xylem may lead to completely block water transport in plant. This may result from cavitation due to freeze-thaw cycles or water stress (Sperry ad Sullivan, 1992). Also injuries of the xylem conduits will also result to water stress and should lead to

early leaf wilting as shown in chrysanthemum cut flowers (Van Meeteren, 1992). A simple methodology used by florists to keep a bouquet turgid for several days consists to make a new cut at the extremity of the stem of flowers under water. This allows limiting xylem embolism, maintaining the leaf transpiration stream and the turgidity of the cells of the shoot. Using this methodology, we subjected twigs of 16 mandarin seedling accessions we previously investigated (Ben Yahmed and al., 2013) to salt stress (Table 1). In such a situation, vessels of the twigs are in direct contact with the solution and Cl^- and Na^+ in solution are directly translocated to leaf in the transpiration stream enabling to quickly characterize the physiological response at leaf level. For each accession, we gave attention to select homogenous twigs with similar leaf number. Our goal was to maintain the control twigs turgid with a quite constant transpiration stream for a time long enough to induce a phenotype for twigs stressed in saline solution. In water, all accessions maintained stable values of g_s and a photosynthesis A activity (Fig. 1A, C) suggesting that along a week, nutritive deficit and embolism were very limited. Interestingly, water consumption per leaf area showed that some accessions such as ‘Willow leaf’, ‘Cleopatra’ and ‘Nasranan’ were able to maintain a much higher transpiration stream compared to accessions of N4 group.

When subjected to salt stress for seven days, large phenotypic changes were observed among the 16 mandarin accessions. ‘Ponkan’, ‘Temple’ and ‘Cleopatra’ were the two accessions that presented the strongest leaf stress phenotype while ‘Beauty’, ‘Vietnam’ and ‘Nasranan’ did not present symptoms (Table 1). Previous experiments performed on seedlings showed that contrary to ‘Cleopatra’ mandarin, ‘Willow leaf’ is very sensitive to salt (Mouhaya et al., 2010; Hussain et al., 2012; Podda et al., 2013; ben Yahmed et al., submitted for publication)) with higher root to shoot Cl^- translocation. A complete opposite trend was observed for ‘Cleopatra’ that presented a strong wilting phenotype while ‘Willow leaf’ twigs remained apparently turgid (Fig. 1D and B respectively). Since the experiment was performed on twigs immersed and cut a second time in the solution, we expected that the only limitation of translocation of saline solution from the tube to the leaves would be the regulation of the transpiration stream occurring through the stomata along the seven days of stress. Figure 2A suggests that the kinetic of closing of the stomata for the different mandarin accessions was different, leading at the end to differences in the amount of saline solution absorbed per unit of leaf area (Fig. 2F). Vietnam presented quite high g_s and A values the first day that remained until the 3rd day and values measured the 7th day were the higher. However, that genotype presented the largest total leaf surface area per twig (Suppl. Fig. 1). This led to little saline solution absorption for that accession, resulting to the lowest

rates of Cl^- and Na^+ measured in leaf and finally may explain why no symptom of stress was observed (Table 1). For other genotypes such as ‘Willow leaf’ and ‘Cleopatra’, stomata closure occurred both on second day (Fig. 2). However, water consumption was observed to be much higher for ‘Willow leaf’ which was correlated with a higher Cl^- and Na^+ absorption. Whatever the accessions, Cl^- and Na^+ contents in leaf were quite different. In solution, according to stoichiometry, Cl^- and Na^+ ions should be at the same concentrations.

For each accession, leaf Cl^- contents were at least 4 times higher than for Na^+ . This suggests that the unloading of both ions from xylem vessels to xylem parenchyma cells and leaves may be differently regulated. In *Arabidopsis*, AtHKT1, which is a Na^+ selective channel/transporter was identified in vascular tissues in leaves (Mäser et al., 2002) and in particular in phloem tissues (Berthomieu et al., 2003). Sunarpi and al. (2005) showed that AtHKT1 mediates the unloading of Na^+ from xylem vessels, thus protecting *Arabidopsis* leaves from sodium stress. Such regulation for Cl^- unloading may be also postulated even though evidences are still scarcer in the literature. Whatever, since the trend of accumulation for both ions was very similar whatever the accessions it may be suspected that in our conditions, the rate of transpiration stream is the main limitation of accumulation of Cl^- and Na^+ in leaves of all the mandarin accessions we investigated (Fig. 3). Since ‘Willow leaf’ and ‘Nasranan’ accessions presented almost twice Cl^- and Na^+ contents than ‘Cleopatra’ without presenting symptoms of wilting, we suspected that specific mechanisms including, ion compartmentalization, osmotic adjustment and/or more efficient detoxification processes may have been triggered to cope with the presence of toxic ions. ‘Dancy’ and ‘Sun Chu Sha’ were the accessions that showed the more limited change of osmotic potential (Fig. 4). This is not surprising for these accessions that strongly limited saline solution absorption (Fig. 2) and consecutively presented the more limited translocation of toxic ions to leaves (Fig. 3).

Interestingly, ‘Willow leaf’ and ‘Nasranan’ did not present lower leaf osmotic potential although they were the highest toxic ions leaf accumulators (Fig. 3) and the highest saline solution consumers (Fig. 2). ‘Willow leaf’ and ‘Nasranan’ showed a high CAT activity, contrary to N5 group of accession, which included Cleopatra (Fig. 5). Conversely, POD activity was more than twice higher in ‘Cleopatra’ compared to ‘Willow leaf’. Regarding H_2O_2 , except ‘Bintangor Sarawak’, most accessions presented more or less the same content and no one of the accessions presented leaf chlorosis. Then, one may wonder if the duration of stress was long enough to trigger strong oxidative stress. By investigating the leaf osmotic potential of seedlings of the same accessions subjected to salt stress (Ben Yahmed et al., submitted for publication), we observed that ‘Willow leaf’, ‘Beauty’ and ‘Fuzhu’ presented

much lower osmotic potential suggesting that osmotic adjustment may be part of the adaptation response to salt stress. ‘Cleopatra’ as a seedling or when grafted is salt tolerant since its roots strongly limit Cl^- translocation to shoots and leaves (Fig. 7A, right upper drawing). However, a sensitive rootstock, such as ‘willow leaf’ seedlings, translocate high rates of Cl^- from root to shoot (Mouhaya et al., 2010) leading to leaf chlorosis symptoms (Fig. 7A, right lower drawing). Then, for breeding programs, it is required to select rootstocks with high potentiality of root Cl^- exclusion. Some accessions we investigated as seedlings that were very sensitive, such as ‘Willow leaf’ or ‘Fuzhu’, did not present symptom when twigs were stressed in saline solution. Conversely, when ‘Cleopatra’ twigs were immersed in saline solution, this accession was observed to be sensitive. Then, different mechanisms may be speculated to explain these twigs phenotype. First, a regulation of gas exchanges through stomata closure may explain the limited water flux and the limited translocation of Cl^- to leaves and consecutively the absence of symptoms as presented for ‘Anana’ or ‘Ponkan’ (Fig. 7A, right upper drawing). Second, a moderate water flux results to some Cl^- translocation and then to leaf and shoot wilting symptoms as we observed in ‘Cleopatra’ (Fig. 7A, right medium drawing). Third, a high water flux results to high Cl^- translocation but do not lead to stress symptoms as presented for ‘Willow leaf’ (Fig. 7A, right lower drawing). Then, we may hypothesize that the accessions presenting shoot tolerance phenotype were able to efficiently compartmentalize toxic ions out of the cytoplasm in order to protect the cells. Indeed, it wouldn’t be surprising that twigs of genotypes considered to be sensitive because they are not able to limit the absorption of toxic ions at root level, may have develop more effective mechanism of tolerance at leaf level. Conversely, twigs of genotypes considered to be tolerant because of their root Cl^- exclusion properties, do not translocate much Cl^- to shoots and may not present specific mechanism of tolerance at leaf level.

In order to confirm the results we obtained, it could be proposed to investigate salt stress tolerance of ‘Cleopatra’ and ‘Willow leaf’ grafted onto ‘Willow leaf’ seedlings. Thus, ‘Cleopatra’ grafted onto ‘Willow leaf’ seedlings are expected to be more sensitive than rootstock/scion ‘Willow leaf’ association. Recently we evaluated citrus seedlings representative of the diversity for salt stress tolerance (Hussain et al., 2013). It would be interesting to evaluate the same genotypes using the same method to see if contrasted results are also observed. Then, if the methodology is validated, it will be possible to easily evaluate new citrus varieties in order to select the one with the better fruit quality properties associated to better salt stress tolerance.

References

- Ashraf**, M. Breeding for salinity tolerance in plants. 1994. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 13: 17-42.
- Bañuls J., Serna M. D., Legaz F., Talon M., Primo-Millo E. 1997. Growth and gas exchange parameters of Citrus plants stressed with different salts. *J. Plant Physiol.* 150: 194-199.
- Berthomieu** P., Conéjéro G., Nublat A., Brackenbury W. J., Lambert C., Savio C., Uozumi N., Oiki S., Yamada K., Cellier F., Gosti F., Simonneau T., Essah P. A., Tester M., Véry AA., Sentenac H., and Casse F. 2003. Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22: 2004-2014.
- Ben Yahmed** J., De Oliveira T., Novillo P., Garcia-Lor A., Salvador A., Ben Mimoun M., Talon M., Ollitrault P., Morillon R. 2013. Salt stress tolerance in mandarin accessions is closely related to their parental genetic origin. Submitted for publication.
- Boehm** J. (1893) Capillarität und Saftsteigen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 11: 203-212.
- Brian** B. and L. Revelant. (1992). Quality management guide citrus. Australian Horticultural Corporation. NSW Agriculture. Australia. P: 53-117
- Byrt**, C. S., Munns, R. Living with salinity. 2008 *New Phytol.* 179: 903-905.
- Castle** W.S., Tucker, D.P.H., Krezdorn A.H. and C.O.Youtsey. 1993. Rootstocks for Florida citrus. 2nd Ed. Univ. Fla. Coop. Ext. Publ, SP-42.
- Cooper** W.C. and B. S. Gorton. 1952. Toxicity and accumulation of chloride salts in citrus on various rootstocks. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 59: 143-146.
- Cooper** W. C. 1961. Toxicity and accumulation of salts in citrus trees on various rootstocks in Texas. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 74: 95-104.
- Dixon** HH., Joly J. 1894. On the ascent of sap. *Ann. Bot.* 8: 468-470.
- Ferguson**, L.; Sakovich, N. and Roose, R. 1990. California citrus rootstocks. Univ. Calif. Publ. P. 21477.
- Garcia-Lor** A., Luro F., Ancillo G., Navarro L., and Ollitrault P. 2013. Genetic diversity and population-structure analysis of mandarin germplasm by nuclear (SSR, indel) and mitochondrial markers. Submitted for publication
- Gomez-Cadenas** A., Tadeo F. R., Talon M., Primo-Millo E. 1996. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* 112: 401-408.
- Gueta-Dahan** Y., Yaniv Z., Zilinskas B. A., Ben-Hayyim G. 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta.* 203: 460-469.

- Hussain S.**, Curk F., Dhuique-Mayer C., Urban L., Ollitrault P., Luro F., Morillon R. 2012. Autotetraploid trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) rootstocks do not impact clementine quality but reduce fruit yields and highly modify rootstock/scion physiology. *Sci. Hortic.* 134: 100-107.
- Iglesias D. J.**, Levy Y., G mez-Cadenas A., Tadeo F. R., Primo-Millo E., Talon M. 2004. Nitrate improvement of growth in salt stressed citrus seedlings through effects on photosynthetic activity and chloride accumulation. *Tree Physiol.* 24: 1027-1034.
- Jackson GE.**, Irvine J., Grace J. 1995. Xylem cavitation in Scots pine and Sitka spruce saplings during water stress. *Tree Physiol.* 15: 783-790.
- Martre P.**, Morillon R., Barrieu F., North G. B., Nobel P. S., and Chrispeels M. J. 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol.* 130: 2101-2110.
- M aser, P.**; Eckelman, B.; Vaidyanathan, R.; Horie, T.; Fairbairn, D.; Kubo, M.; Yamagami, M.; Yamaguchi, K.; Nishimura, M.; Uozumi, N. 2002. Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in Arabidopsis by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. *FEBS Lett.* 531: 157-161.
- Mouhaya, W.**, Allario, T., Brumos, J., Andres, F., Froelicher, Y., Luro, F., Talon, M., Ollitrault, P., Morillon, R., 2010. Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability and correlates with expression of candidate genes. *Func. Plant Biol.* 37: 674-685
- Moya, J.L.**, Gomez-Cadenas, A., E. Primo-Millo and M. Talon. 2003. Chloride tolerance in salt sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water usage. *J. Exp. Bot.* 383: 825-833
- Podda A.**, Checcucci G., Mouhaya W., Centeno D., Rofidal V., Del Carratore R., Luro F., Morillon R., Ollitrault P., Maserti BE. 2013. Salt-stress induced changes in the leaf proteome of diploid and tetraploid mandarins with contrasting Na⁺ and Cl⁻ accumulation behaviour. *J. Plant Physiol.* 170: 1101-1112.
- Quinones A.** 2013. Personnal communication.
- Richter H.** Wie entstehen Saugspannungsgradienten in B umen? 1972. Bericht der Deutschen botanischen Gesellschaft (85): 341–351.
- Romero-Aranda, R.**; Moya JL., Tadeo FR., Legaz F., Primo-Millo E., Talon M. 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant, Cell Environ.* 21: 1243–1253.

- Sperry, J.S.** and J.E.M. Sullivan. 1992. Xylem embolism in response to freeze–thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous, and conifer species. *Plant Physiol.* 100: 605-613.
- Storey, R.;** Walker, R. R. 1998. Citrus and salinity. *Sci. Hortic.* 78: 39-81.
- Sunarpi,** Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W.-Y., Leung, H.-Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J. I., Uozumi, N., 2005. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem parenchyma cells. *Plant J.* 44: 928-938.
- Tyree MT.,** Davis SD., Cochard H. 1994. Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a trade off of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? *Int. Assoc. Wood Anat. J.* 15: 335-360
- Van Meeteren,** U. 1992. Role of air embolism and low water temperature in water balance of cut chrysanthemum flowers. *Sci.Hort.* 51: 275-284.
- Walker,** RR.; Torokfalvy E. ; Grieve, AM. and LD. Prior. 1983. Water Relations and Ion Concentrations of Leaves on Salt-Stressed Citrus Plants. *Austral. J. Plant Physiol.* 10: 265-277
- Wutscher,** HK.1979. Citrus rootstocks. *Hort. Reviews.* 1: 237-269.
- Zekri,** M., Parsons, L.R., 1992. Salinity tolerance of citrus rootstocks: effect of salt on root and leaf mineral concentrations. *Plant Soil.* 147: 171-181.

Tab.1: Symptoms observed in mandarin twigs after 7 days of salt stress. For each accession is given the common name, the San Giuliano Agronomical Research Station Numbering (SRA), the genetic parental origin according to Garcia-Lor et al., (2013), and the observed symptoms.

Mandarin names	SRA	Group, N	Intensity of symptoms	Symptoms
Ponkan	584	1	****	Very sensitive accession: strong curling, drying and wilted leaves
Fuzhu	775	1	*	Strong leaf curling with slight wilted end of leaves
Dancy	552	1	*	Very low apparent symptoms
Nanfen Miguan	700	2	*	Slightly wilted leaves
San hu hong chu	769	2	*	Very low apparent symptoms
Willow leaf	133	3	*	No leaf curling, leaves slightly wilted
Bintangor Sarawak	683	3	***	Strong leaf curling
Beauty	411	4	—	Most tolerant: no symptom
Temple	348	4	****	Wilting and curling of leaves
Vietnam à peau fine	766	4	—	Most tolerant: no symptom
Cleopatra	948	5	***	Wilting and curling of leaves
Anana	652	5	**	Wilted and curling of leaves
Shekwasha	982	5	*	Slight wilting of leaves
Sun Chu Sha	786	5	*	Slight wilting of eaves
King of Siam	273	?	**	Leaf curling
Nasnaran	896	?	-	Most tolerant: no symptom

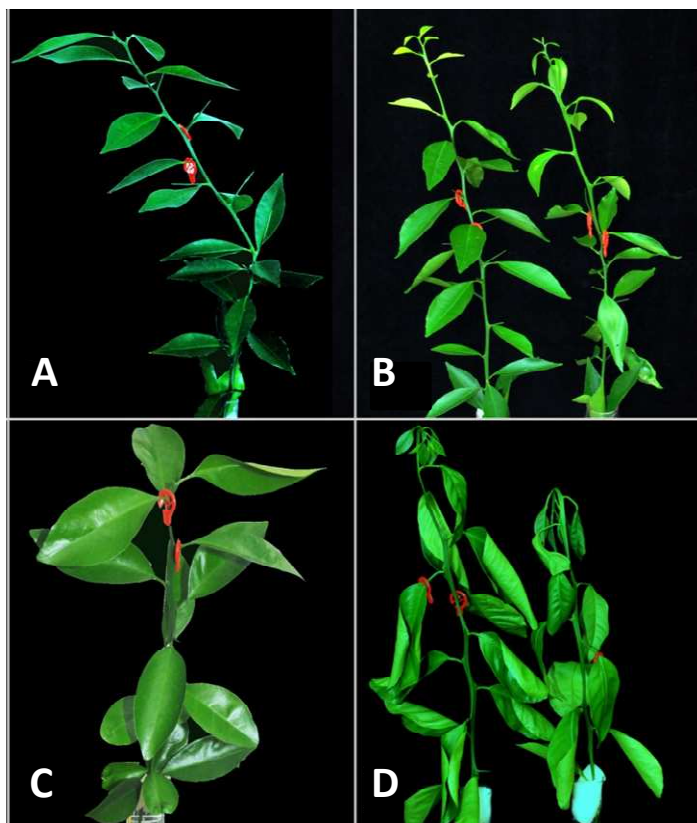


Fig.1: Pictures showing the symptoms induced by salt stress on isolated twigs of ‘Willow leaf’ and ‘Cleopatra’ mandarins plunged in water and saline solution for 7 days. A) Control twig of ‘Willow Leaf’ after seven days in water. B) ‘Willow Leaf’ twigs after 7 days of salt stress. C) ‘Cleopatra’ control twig after seven days in water. D) ‘Cleopatra’ twigs after 7 days of salt stress.

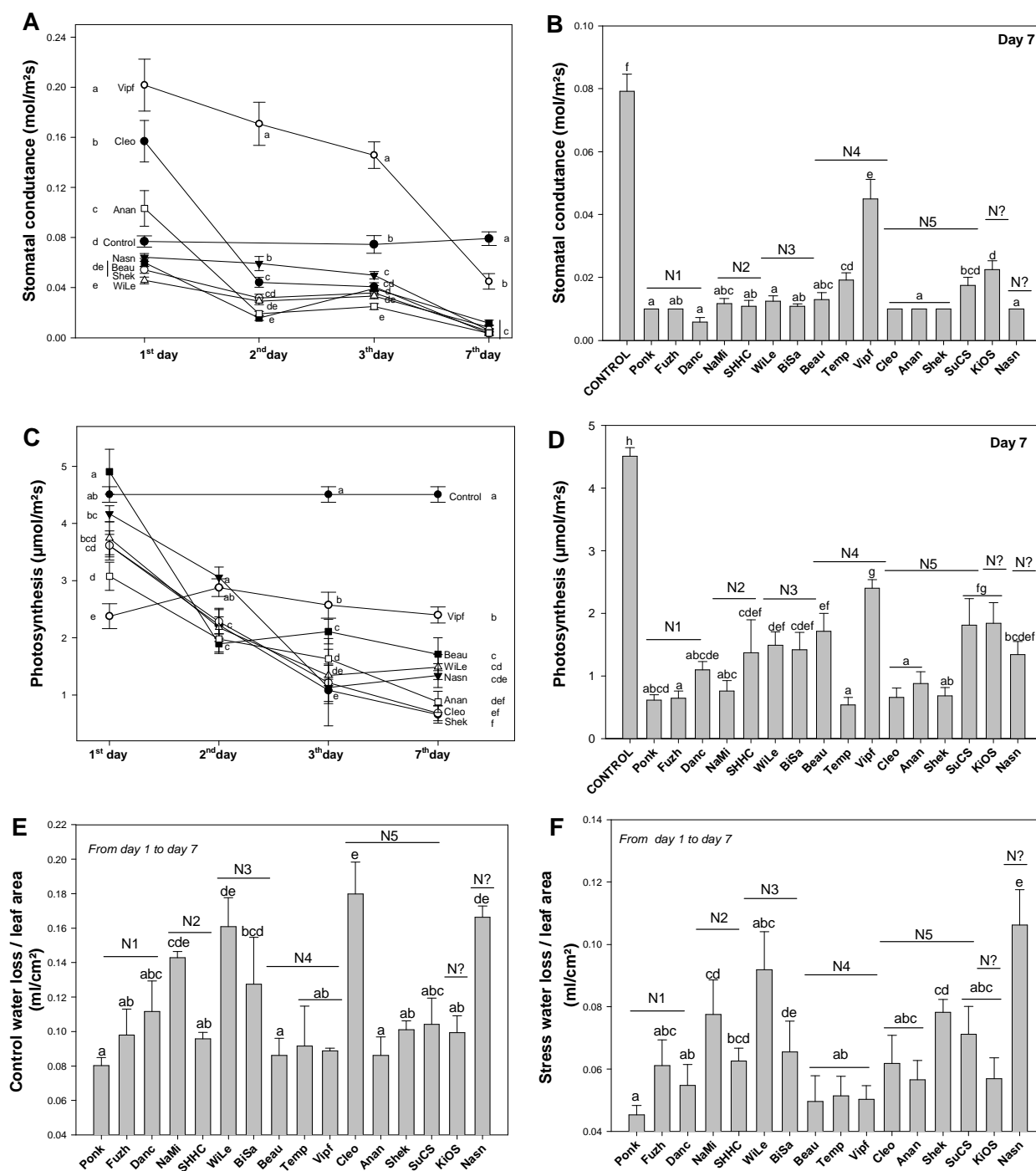


Fig.2: Stomatal conductance, photosynthesis, and water loss measured on isolated twigs of 16 mandarin accessions maintained for 7 days in salt solution. A) Stomatal conductance of six representative accessions of mandarin monitored for 7 days of salt stress. For each date, the control represents the mean value for the 16 cultivars. B) Stomatal conductance based on the stress/control ratio after 7 days of salt stress. C) Photosynthesis of representative cultivars of mandarins for 7 days of salt stress. For each date, the control represents the mean value for the 16 cultivars. D) Photosynthesis based on stress/control ratio after 7 days of salt stress. E) Water consumption of the 16 accessions based on leaf twig area after 7 days in control condition. F) Water consumption of 16 cultivars based on leaf twig area after 7 days in salt condition. Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P < 0.05$, $n \geq 30$). The NX groups represent the genetic groups.

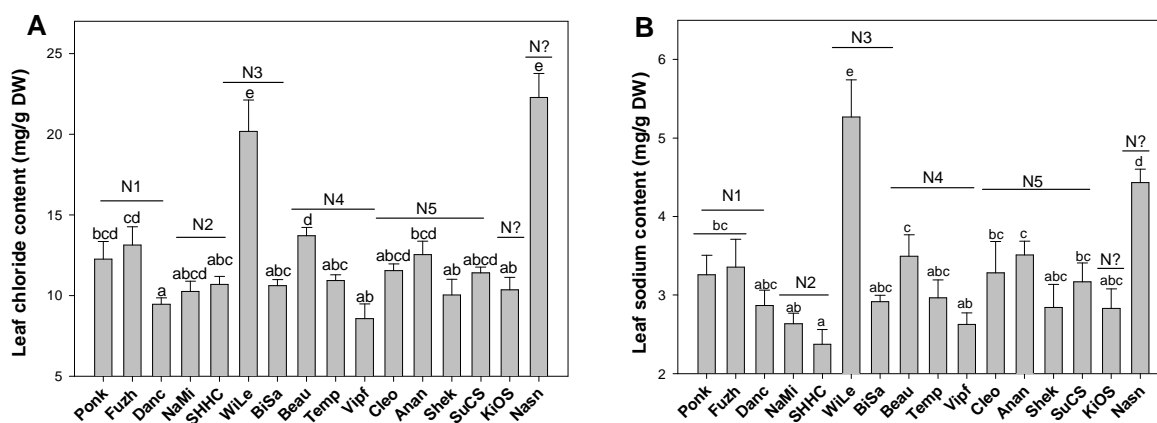


Fig.3: Chloride and sodium content in leaves of isolated twig of the 16 mandarin accessions maintained for 7 days in salt solution (50 mM of NaCl). (A) Leaf chloride content. (B) Leaf sodium content. Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P < 0.05$, $n \geq 9$). NX represent the genetic groups.

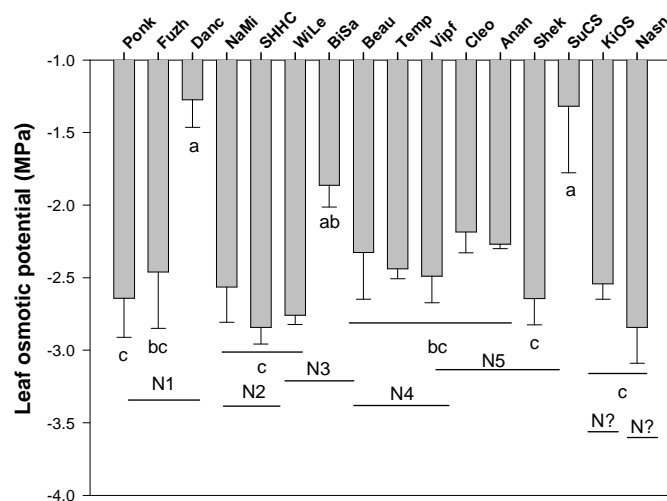


Fig.4: Leaf osmotic potential measured in leaves of isolated twigs of the 16 mandarin accessions maintained for 7 days in salt solution. Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P < 0.05$, $n \geq 5$).

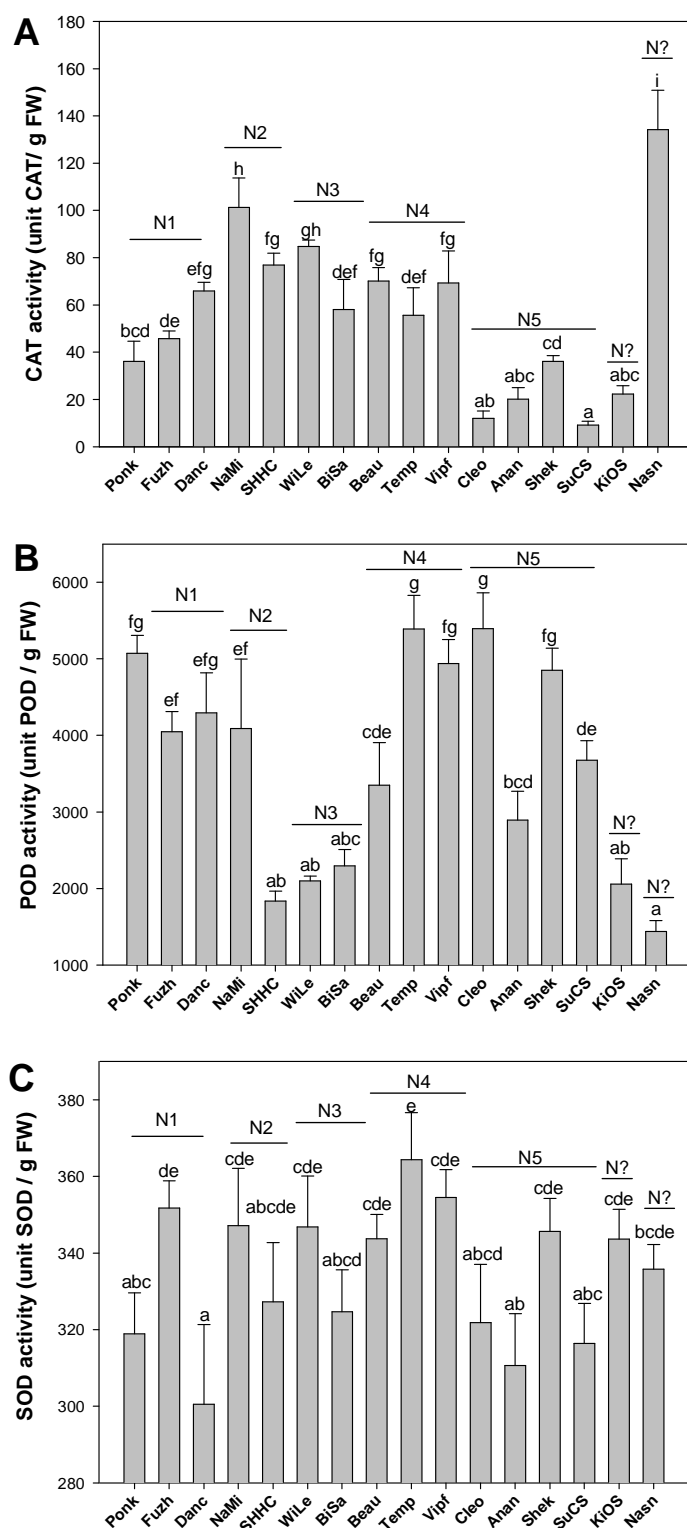


Fig.5: Antioxidant enzyme specific activities (CAT, POD, SOD) determined in leaves of isolated twigs of the 16 mandarin accessions maintained for 7 days in salt solution (50 mM of NaCl). A) Catalase specific activity. B) Peroxydase activity. C) Superoxyde Dimustase activity. Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P < 0.05$, $n = 9$). The NX groups represent the genetic groups.

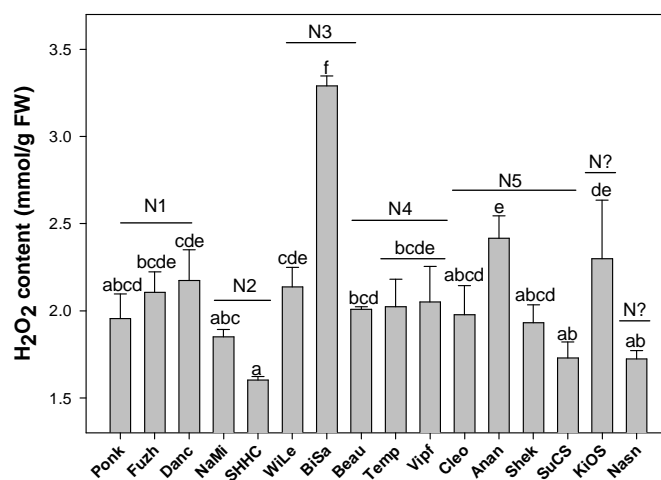


Fig.6: Hydrogen peroxide content in leaves of isolated twigs of the 16 mandarin accessions maintained for 7 days in salt solution (50 mM of NaCl). Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P < 0.05$, $n = 9$). The NX groups represent the genetic groups.

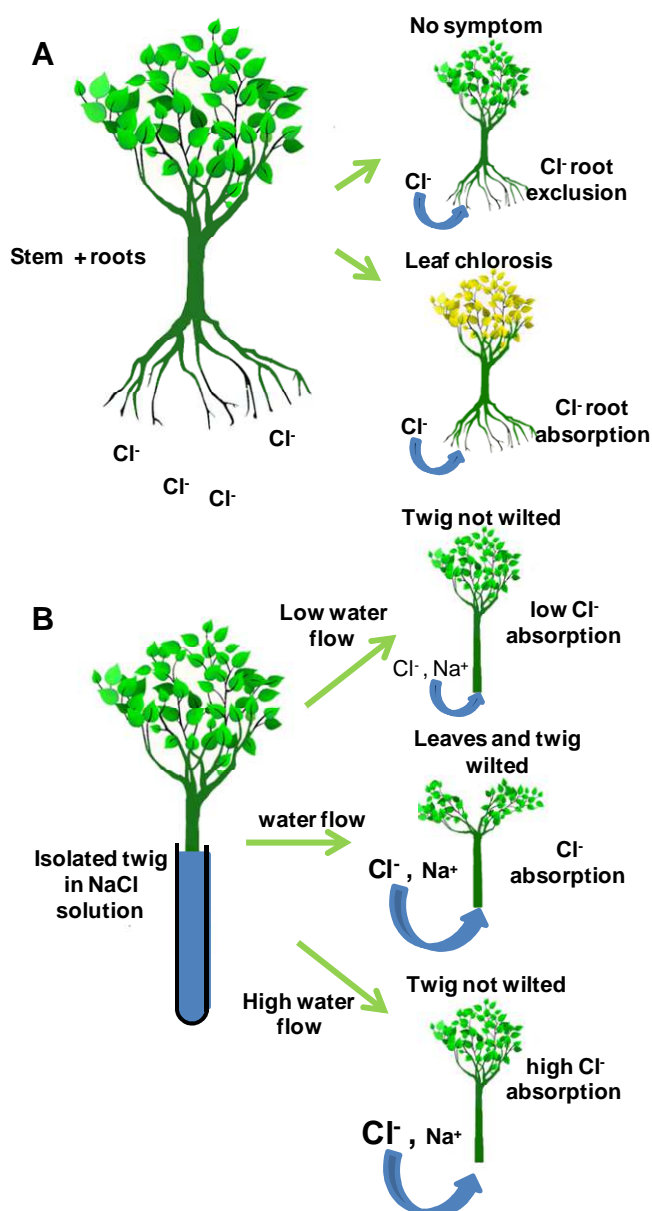
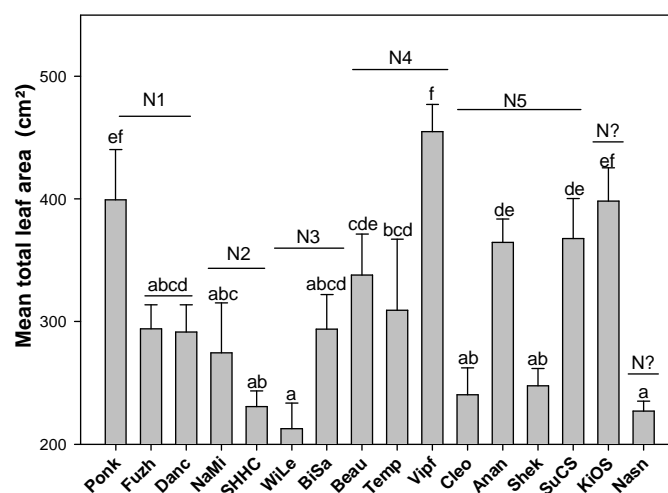


Fig.7: Schematic model showing the behavior of citrus trees or isolated twigs subjected to salt stress. A) For salt stress tolerant seedlings Cl^- root exclusion occurs which limits the apparition of leaf symptoms. In salt sensitive seedlings, Cl^- is translocation from root to shoot will lead to high leaf chloride accumulation and leaf chlorosis. B) When working with cut twigs plunged in salt solution, it is possible to set aside of root exclusion mechanism and study the tolerance to salt of the aerial part. Apparition of wilting symptoms is then dependant of the regulation of the absorption of Cl^- through the transpiration stream but also to the capacity of leaf cells to cope with high Cl^- contents.

Supplemental Table 1: Macro element and micro element contents in leaves of isolated twigs of 16 mandarin accessions after seven days of salt stress. All data are presented as mean values (\pm S.E.) of six independent measurements (n = 6). Different letters indicate significant differences between genotypes.

Mandarin accessions	Microelement content (ppm : μ g/g DW)					Macroelement (g / g DW)				
	Boron (B)	Cooper (Cu)	Iron (Fe)	Manganese (Mn)	Zinc (Zn)	Calcium (Ca)	Potassium (K)	Magnesium (Mg)	Phosphorus (P)	Sulfur (S)
Ponkan	43.62 \pm 1.303fg	5.23 \pm 0.219bcde	78.16 \pm 14.397bcd	169.00 \pm 14.601cde	27.14 \pm 3.973cd	1.44 \pm 0.094abcd	0.55 \pm 0.045ab	0.16 \pm 0.003bcd	0.21 \pm 0.024abcd	0.12 \pm 0.007abc
Fuzhu	28.47 \pm 0.650abcd	5.30 \pm 0.484bcde	87.20 \pm 17.838d	134.29 \pm 4.98abcd	23.81 \pm 1.906abcd	1.21 \pm 0.058ab	0.53 \pm 0.066ab	0.15 \pm 0.006abc	0.24 \pm 0.034bcde	0.14 \pm 0.007abc
Dancy	41.89 \pm 5.662fg	4.31 \pm 0.612abcd	67.79 \pm 10.336bcd	129.98 \pm 10.270abcd	23.12 \pm 2.148abcd	1.62 \pm 0.121bcd	0.40 \pm 0.058ab	0.13 \pm 0.006abc	0.22 \pm 0.019abcd	0.15 \pm 0.005abc
Nanfen Miguan	37.37 \pm 7.049defg	6.17 \pm 0.522de	86.05 \pm 12.877d	150.47 \pm 33.576bcde	20.52 \pm 1.914abc	1.97 \pm 0.400abcd	0.40 \pm 0.041ab	0.12 \pm 0.011ab	0.21 \pm 0.008abc	0.15 \pm 0.005abc
San Hu Hong Chu	26.27 \pm 3.119abcd	3.99 \pm 0.922abc	59.10 \pm 7.271abcd	174.47 \pm 15.581cd	22.56 \pm 4.922abcd	1.69 \pm 0.405bcd	0.58 \pm 0.069c	0.11 \pm 0.011a	0.19 \pm 0.013ab	0.14 \pm 0.012abc
Willow leaf	46.21 \pm 3.892g	3.94 \pm 0.386abc	79.02 \pm 9.722cd	187.31 \pm 12.843e	25.05 \pm 1.954bcd	1.86 \pm 0.074d	0.52 \pm 0.055ab	0.18 \pm 0.008d	0.40 \pm 0.044e	0.11 \pm 0.006a
Bintangor Sarawak	28.76 \pm 3.570abcd	3.42 \pm 0.6761ab	50.26 \pm 3.019abc	112.43 \pm 7.945ab	16.49 \pm 1.316a	1.38 \pm 0.134abcd	0.36 \pm 0.028a	0.13 \pm 0.011ab	0.22 \pm 0.005abcd	0.12 \pm 0.020abc
Beauty	57.89 \pm 4.299h	5.99 \pm 1.240de	63.60 \pm 9.811abcd	176.59 \pm 28.797cd	27.37 \pm 3.774cd	1.82 \pm 0.184cd	0.44 \pm 0.037ab	0.14 \pm 0.008abc	0.28 \pm 0.039cd	0.14 \pm 0.013abc
Temple	34.72 \pm 3.808cdef	5.78 \pm 0.190cde	49.27 \pm 3.712ab	101.35 \pm 2.159a	28.19 \pm 2.283d	1.51 \pm 0.157abcd	0.36 \pm 0.007a	0.13 \pm 0.011abc	0.23 \pm 0.014abcd	0.16 \pm 0.002abc
Vietnam	22.26 \pm 3.598ab	5.97 \pm 0.501de	66.79 \pm 10.050abcd	117.08 \pm 4.689ab	18.66 \pm 0.479ab	1.37 \pm 0.208d	0.46 \pm 0.039ab	0.10 \pm 0.004ab	0.22 \pm 0.009abcd	0.13 \pm 0.003abc
Cleopatra	36.87 \pm 5.008defg	4.97 \pm 0.697abcd	79.39 \pm 16.918cd	115.33 \pm 10.196ab	27.65 \pm 2.776cd	1.74 \pm 0.380cd	0.49 \pm 0.079ab	0.17 \pm 0.019cd	0.22 \pm 0.016abcd	0.14 \pm 0.012abc
Anana	41.16 \pm 6.051efg	5.16 \pm 0.791bcde	52.35 \pm 6.407abc	126.24 \pm 17.785abc	24.96 \pm 0.704bcd	1.59 \pm 0.232bcd	0.53 \pm 0.041ab	0.15 \pm 0.011bcd	0.27 \pm 0.018bcd	0.13 \pm 0.010abc
Shekwasha	24.18 \pm 2.248abc	6.98 \pm 1.040e	82.80 \pm 8.533d	150.74 \pm 12.903bcde	24.93 \pm 0.632bcd	1.20 \pm 0.150abc	0.56 \pm 0.064ab	0.14 \pm 0.012abc	0.22 \pm 0.017abcd	0.17 \pm 0.013c
Sun Chu Sha	22.74 \pm 2.262ab	4.65 \pm 0.783abcd	52.68 \pm 5.623abc	124.53 \pm 19.222abc	25.38 \pm 3.997bcd	1.41 \pm 0.060abcd	0.36 \pm 0.005ab	0.12 \pm 0.011ab	0.25 \pm 0.018abcd	0.12 \pm 0.008ab
King of Siam	17.59 \pm 1.392a	3.07 \pm 0.415a	37.44 \pm 4.279a	102.51 \pm 14.662a	20.38 \pm 2.384abc	1.33 \pm 0.110a	0.37 \pm 0.088c	0.13 \pm 0.012ab	0.20 \pm 0.03a	0.11 \pm 0.012bc
Nasnaran	30.28 \pm 3.56bcde	4.41 \pm 0.434abcd	66.94 \pm 7.429bcd	114.60 \pm 15.606ab	20.17 \pm 1.267abc	1.34 \pm 0.123abcd	0.31 \pm 0.090a	0.12 \pm 0.017abc	0.37 \pm 0.031d	0.09 \pm 0.007ab



Supp. Fig 1: Mean total leaf area of isolated twigs of the 16 mandarin accessions maintained for 7 days in salt solution. Values (mean \pm S.E.) with different letters were significantly different ($P < 0.05$, $n \geq 5$). The NX groups represent the genetic groups.

Conclusion générale

Et

Perspectives

Le but de mon travail a été de caractériser les propriétés de tolérance au déficit hydrique et au stress salin de génotypes appartenant au genre *Poncirus* et au groupe des mandariniers. *In fine*, il était escompté de pouvoir identifier des génotypes pouvant être intéressants en tant que géniteurs dans les programmes d'amélioration génétique de porte-greffes et de sélection variétale chez les agrumes.

Dans le premier article présenté dans ce manuscrit de thèse, nous avons analysé plusieurs marqueurs SSR qui nous ont permis d'identifier deux groupes génétiques distincts au sein des *Poncirus*. Nous avons pu mettre en évidence l'existence de corrélations entre les caractères morphologiques étudiés, les propriétés d'adaptation au déficit hydrique et l'appartenance aux deux groupes génétiques. Dans le second article, en se basant sur la diversité précédemment mise en évidence chez les mandariniers, nous avons observé que certains mandariniers doux présentaient des tolérances au stress salin semblables à celles observées chez les mandariniers acides. Nous avons également constaté que certains traits d'adaptation pouvaient être liés à l'origine génétique des génotypes étudiées. Enfin, dans un troisième article, est présentée une méthode simple pour évaluer les propriétés de tolérance au stress salin du scion de plusieurs accessions de mandariniers. Cette étude réalisée sur des rameaux isolés suggère l'existence de mécanismes spécifiques pouvant être responsables, au niveau des feuilles, d'une meilleure adaptation au stress salin.

Etude de la diversité au sein du genre *Poncirus* (*Poncirus trifoliata* Raf.) : Caractérisation moléculaire et évaluation des propriétés de tolérance au déficit hydrique

Nous avons pu mettre en évidence grâce à l'analyse des 17 marqueurs SSR, l'existence de deux groupes génétiques distincts de *Poncirus*. L'étude réalisée par Fang et al. (1997) avait déjà mis en évidence des résultats similaires. Selon ces auteurs, les différents génotypes analysés pouvaient être répartis en deux groupes: un groupe ayant des larges fleurs et l'autre groupe ayant des petites fleurs. Cette même structuration de la diversité a également été observée lors d'une étude plus récente réalisée par Uzun et al. (2009). La caractérisation phénotypique que nous avons réalisée a consisté à étudier la taille des graines, la surface des feuilles et la taille des fleurs, et cela nous a permis de mettre en évidence l'existence de fortes corrélations entre les caractères morphologiques étudiés et l'appartenance à l'un ou l'autre des groupes génétiques. Notre étude montre que la taille des fleurs est un caractère plus variable que la surface foliaire et constitue ainsi un paramètre plus discriminant pour la classification des *Poncirus* dans les groupes génétiques 1 ou 2. L'analyse du comportement de tolérance au

déficit hydrique de génotypes de Poncirus représentatifs des deux groupes génétiques a montré l'existence d'une corrélation entre l'appartenance à un groupe génétique donné et les propriétés d'adaptation au déficit hydrique. Nos résultats montrent que les génotypes appartenant au premier groupe sont plus sensibles au déficit hydrique que les génotypes du groupe 2: le Poncirus « Rubidoux ICVN-101033 » est apparu comme étant l'un des génotypes les plus tolérants tandis « Pomeroy » s'est révélé être l'un des plus sensibles. De plus, les génotypes qui sont les plus tolérants étaient ceux ayant les plus petites surfaces foliaires totales comme c'est le cas du « Jacobsen ICVN-110106 » et du « Rubidoux ICVN-101033 ». Depuis les années 2000, l'IVIA en Espagne propose de nouveaux porte-greffes obtenus par hybridation et utilisant le Poncirus « Rubidoux » comme parent mâle et les mandariniers « Cléopâtre » ou « King » comme parent femelle. Il s'agit du « Forner Alcaide 5 » (F&A 5), du « Forner Alcaide 418 » (F&A 418), du « Forner Alcaide 13 » (F&A 13) et du « Forner Alcaide 517 » (F&A 517) qui sont tous résistants ou tolérants au virus de la Tristeza. Les résultats obtenus depuis près de vingt ans sur ces nouveaux porte-greffes montrent que les hybrides générés ont de très bonnes capacités d'adaptation aux contraintes biotiques et abiotiques (Figure 1).

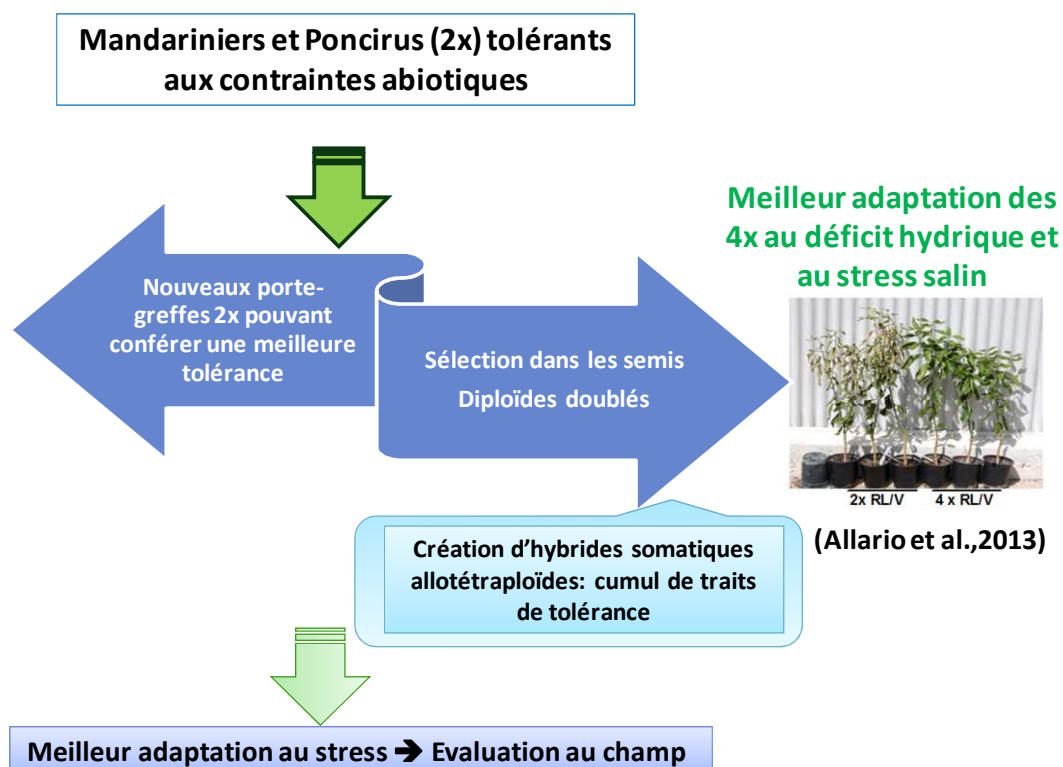


Figure 1 : Stratégie d'innovation variétale

De façon originale, «Feuilles Moyennes ICVN-110412 » est le génotype qui présentait la surface foliaire la plus importante, une forte densité et une grande taille des stomates, mais n'a pas semblé être affecté par le stress dans la mesure où, à la fin de l'expérimentation, il présentait un potentiel hydrique du sol relativement haut. Ce génotype pourrait donc être intéressant comme géniteur, dans les programmes de sélection de porte-greffes, dans la mesure où il pourrait présenter des propriétés d'ajustement osmotique supérieures aux autres génotypes. Des dosages des différents osmotocums impliqués dans l'adaptation pourraient être envisagés pour confirmer cette hypothèse.

Les résultats obtenus à l'aide des marqueurs moléculaires ne permettaient de cibler que des portions extrêmement limitées du génome. Le séquençage des génomes des *Poncirus* du « Rubidoux » et « Pomeroy » vient d'être réalisé dans le cadre du consortium de génomique espagnol. Il devrait donc être possible de mieux comprendre les différences génomiques entre ces deux génotypes et avoir des informations intéressantes en ce qui concerne l'expression des génomes et leur adaptation vis-à-vis des contraintes environnementales.

Malgré les différences observées entre les génotypes de *Poncirus*, nos analyses ont montré que le genre *Poncirus* constitue un groupe assez étroit. L'analyse des paramètres phénotypiques nous a permis de mettre en évidence des corrélations entre différents caractères phénotypiques et l'appartenance à l'un ou l'autre des groupes génétiques. Néanmoins, les paramètres morphologiques étudiés séparément ou ensemble sont inutiles pour effectuer systématiquement une bonne classification des accessions. La faible diversité phénotypique et l'absence de caractères morphologiques distinctifs contribuent à une fausse identification et une classification erronée d'accessions de *Poncirus*. La seule façon de classer avec certitude chaque accession de *Poncirus* est donc de les génotyper au moyen de marqueurs moléculaire.

Les *Poncirus* «Rubidoux », « Flying Dragon » et «Pomeroy » ont été utilisés comme porte-greffes (Rocca Serra et Ollitrault, 1992; Espinosa-Nunez et al., 2011, Schinor et al., 2013) ou dans les programmes de sélection en association avec d'autres agrumes tels que les mandariniers «Cléopâtre» ou «Sunki» pour conférer une tolérance à la CTV (Rocca Serra et Ollitrault, 1992). Toutefois, il existe encore peu de données concernant les caractères de tolérance au déficit hydrique chez les *Poncirus* quand ils sont greffés. L'étude que nous avons réalisée suggère que les génotypes qui appartiennent au groupe génétique 2 de *Poncirus* sont plus tolérants. Il pourrait donc être intéressant de comparer la tolérance au déficit hydrique des génotypes du groupe 1 et 2 lorsqu'ils sont greffés avec une variété afin de vérifier si les porte-greffes de *Poncirus* du groupe 2 confèrent également une meilleure tolérance au déficit hydrique à la variété.

Caractérisation de la tolérance au stress salin de 16 accessions représentatives de la diversité existante au sein du groupe des mandariniers

L'étude du comportement, en condition de stress salin, de 16 accessions de mandariniers représentatives de la diversité suggère que les traits de tolérances mis en évidence peuvent être liés à l'origine ancestrale des espèces. Il semble que les mandariniers ayant hérités des portions de génomes de *C. maxima* ou *Papeda* présentent une tolérance accrue à la salinité. En effet, des traits de tolérance ont pu être observés chez certains mandariniers doux tels que « Temple » et « Anana ». Ces traits de tolérance pourraient être attribués à la présence de portion du génome de *C. maxima* dont la tolérance a été révélée lors d'études précédentes (Hussain et al., 2012). De plus, un comportement similaire a été constaté chez d'autres mandariniers tels que les mandariniers « King of Siam » et « Shekwasha », ce qui pourrait s'expliquer par l'introggression de portions du génome *Papeda*, qui semblent être également tolérant à la salinité. Parmi les mandariniers étudiés, des comportements très différents ont pu être mis en évidence. Les variétés acides utilisées comme porte-greffes, ont été identifiées comme étant tolérantes avec une translocation limitée des ions Cl^- de la racine vers les feuilles comme c'est le cas pour les mandariniers « Cléopâtre » et « Shekwasha ».

Certaines variétés douces ont montré des traits de tolérance similaires. Des symptômes de stress limités associés à une faible translocation de Cl^- des racines vers la partie aérienne ont pu être notés chez les mandariniers « San Hu Hong Chu » et « Vietnam ». Ces résultats suggèrent que ces génotypes pourraient être intéressants pour les programmes d'amélioration génétique. Au contraire, de fortes accumulations de Cl^- foliaire avec de fortes chloroses ont pu être observées chez d'autres variétés comme les mandariniers « Willow leaf » et « Beauty ». Cela suggère que ces génotypes ne peuvent pas être considérés comme de bons géniteurs dans les programmes de sélection de porte-greffes résistants au stress salin. L'étude a également révélé une forte accumulation de Cl^- foliaire observée chez le mandarinier « King of Siam » accompagnée par de fortes chutes foliaires alors que les feuilles demeuraient vertes. Ce comportement pourrait caractériser un mécanisme d'évitement responsable de l'évacuation des Cl^- en excès par une chute des feuilles afin de maintenir la croissance des plants (Arbona et al., 2003; Iglesias et al., 2007; Arbona et al., 2009). Enfin pour les génotypes de mandariniers doux, le fait d'accumuler de grandes quantités de Cl^- foliaires sans toutefois présenter de phénotypes de sensibilité pourrait être lié à de meilleures propriétés de détoxification ainsi qu'à une meilleure compartimentation cellulaire des ions toxiques. Le séquençage des génomes de plusieurs mandariniers vient d'être réalisé dans le cadre du

consortium de génomique espagnol. On va donc disposer prochainement des informations nécessaires pour vérifier précisément quelles ont été les introgressions pour les différents génotypes étudiés. Il va donc ainsi être possible comprendre les différences génomiques entre les mandariniers et peut être de pouvoir identifier les gènes pouvant être à l'origine de phénotypes d'adaptation au stress salin. Enfin, cette étude de tolérance vis-à-vis des contraintes salines pourrait être étendue à une diversité plus large dans le groupe des mandariniers. Peut-être serait-il ainsi possible d'identifier des génotypes ayant d'autres propriétés particulières d'adaptation à la salinité.

Pour notre deuxième volet, et en sachant que la plupart des porte-greffes d'agrumes utilisés dans l'agrumiculture appartiennent aux groupes mandariniers et au genre *Poncirus* et apparentés, les résultats obtenus, grâce à notre étude, nous amènent à conclure que le mandarinier « Anana » présente les mêmes caractéristiques de tolérance que les génotypes du groupe des mandariniers acides. En situation de stress, le mandarinier « Anana » présentait un potentiel osmotique similaire au mandarinier « Cléopâtre » suggérant que ce génotype présente de bonnes propriétés d'ajustement osmotique et qu'il pourrait donc être considéré comme un bon géniteur dans les programmes d'amélioration génétique. On a pu aussi déterminer que l'ensemble des génotypes porteurs d'une portion du génome *Papeda* et de *C. maxima* présentent une meilleure tolérance vis-à-vis de la salinité. C'est le cas « San Hu Hong Chu » qui présente un comportement de tolérance très similaire à « Cléopâtre », et présente également un développement limité. Ce génotype pourrait être intéressant pour les programmes de création de porte-greffes tolérants à la salinité dans la mesure où il confère une faible vigueur aux arbres et permettrait ainsi un mode de culture intensive. Pour ces mandariniers doux, il nous a paru beaucoup plus difficile de présenter un dessin clair sur l'adaptation aux contraintes salines. Les critères de sélection variétales, se basent en général, sur la qualité des fruits et sur la production. Notre étude a révélé que les mandariniers « Willow leaf » et « Beauty », très utilisés dans les programmes d'amélioration variétale, sont de forts accumulateurs de Cl^- foliaire et présentent des symptômes de sensibilité importants au sel. Pour ces accessions, on a pu mettre en évidence l'absence de mécanismes de limitation du transfert de Cl^- de la racine vers la partie aérienne. On peut donc se demander si les tolérances observées chez ces accessions de mandariniers doux sont liées à des mécanismes de tolérance au niveau de la feuille comme par exemple une meilleure compartimentation ou détoxification. Des études de tolérance au stress salin d'un ensemble de variétés sélectionnées comme tolérantes greffées sur des porte-greffes tolérants et sensibles permettraient de confirmer l'intérêt potentiel de leurs propriétés de la tolérance au stress salin.

Etude des propriétés de tolérance au stress salin de rameaux isolés de mandariniers : une nouvelle méthode pour caractériser la tolérance au sel des variétés

Les résultats mis en évidence lors de notre précédente étude nous ont amené à nous poser la question sur l'existence potentielle de mécanismes spécifiques, situés au niveau des feuilles, et responsables des traits de tolérance observés chez certains mandariniers doux. Des expérimentations sur rameaux isolés prélevés sur les plants témoins des géotypes mandariniers précédemment étudiés ont été réalisées.

Nos résultats montrent trois types de réponse au stress : des faibles accumulations foliaires accompagnées par de fort phénomène de flétrissement, de fortes accumulations de chlorures avec de graves symptômes de stress et finalement de fortes accumulations de chlorures sans montrer de traits de sensibilité. De façon originale nous avons constaté que les géotypes accumulant de fortes concentrations en Cl^- lorsque les plants étaient francs de pied étaient les plus tolérants sur rameaux isolés. On pourrait donc supposer que cette meilleure tolérance pourrait être attribuée à une bonne compartimentation ionique et une bonne détoxification. Nos résultats ont montré que certains géotypes comme « Dancy » limitent la translocation des ions chlorures en réduisant l'absorption de la solution saline. Pour ce géotype, on a noté de faibles variations du potentiel osmotique. Cela suggère que ce mandarinier ferme ces stomates, assure un bon ajustement osmotique ce qui permet de maintenir une bonne turgescence cellulaire.

De plus lors de cette étude, en comparant le comportement des mandariniers « Willow leaf » et « Cléopâtre », on a pu constater que le mandarinier « Cléopâtre » présente de fort flétrissements, un fort flux de transpiration important et une quantité de Cl^- estimée à la moitié de la teneur observée chez « Willow leaf ». On pourrait donc conclure dans un premier lieu que la tolérance observée chez « Cléopâtre » est liée exclusivement à l'exclusion racinaire chez les plants francs de pied et qu'en l'absence de racines, « Cléopâtre » n'induit pas de mécanismes de régulation du flux de transpiration par fermeture stomatique afin de limiter la translocation de ions Cl^- de la solution saline aux feuilles. Les effets des ions toxiques apparaissent directement au niveau foliaire en absence de mécanismes foliaires spécifiques. Ces résultats paraissent de grande importance dans la mesure où ils montrent des traits de tolérance chez des mandariniers désignés comme sensibles sur franc de pied par plusieurs études.

Cette méthode est simple et permet sur un temps court d'évaluer la réponse des plantes et semble permettre de mettre en évidence l'existence de mécanismes spécifiques intervenant

dans l'adaptation au stress au niveau foliaire (Figure 2). Mise en œuvre en parallèle au test sur les semis, elle permet de classer directement les plants en accumulateurs de Cl^- foliaires ou exclure au niveau des racines. Néanmoins, lors de cette étude sur rameaux isolés, nous n'avons pas observé de phénomènes de chlorose même sur les génotypes montrant de forts flétrissements. Cela peut être dû à la courte durée de l'expérimentation ou bien à la trop forte concentration en sel imposée. Il sera intéressant de tester le comportement de ces rameaux sur une durée plus longue et à des concentrations moins élevées. Concernant les systèmes antioxydants, même si certaines différences ont été observées pour l'activité enzymatique, le taux de peroxyde d'hydrogène est resté le même pour l'ensemble des génotypes, incluant les génotypes considérés comme sensibles et les tolérants. On peut donc se poser la question de savoir si la durée du stress a été suffisante pour activer les systèmes de détoxication. Enfin, si la méthodologie est validée, il sera possible d'évaluer facilement le comportement de nouvelles variétés d'agrumes afin de choisir celles avec les meilleures propriétés de qualité des fruits associés à une meilleure tolérance au stress salin. Cette méthode pourrait donc être intéressante, par exemple, dans la sélection de nouvelles variétés triploïdes présentant des fruits aspermes de qualité mais également présentant de traits de tolérance au stress salin ou bien encore pour étudier la tolérance au stress salin de la diversité agrumes.

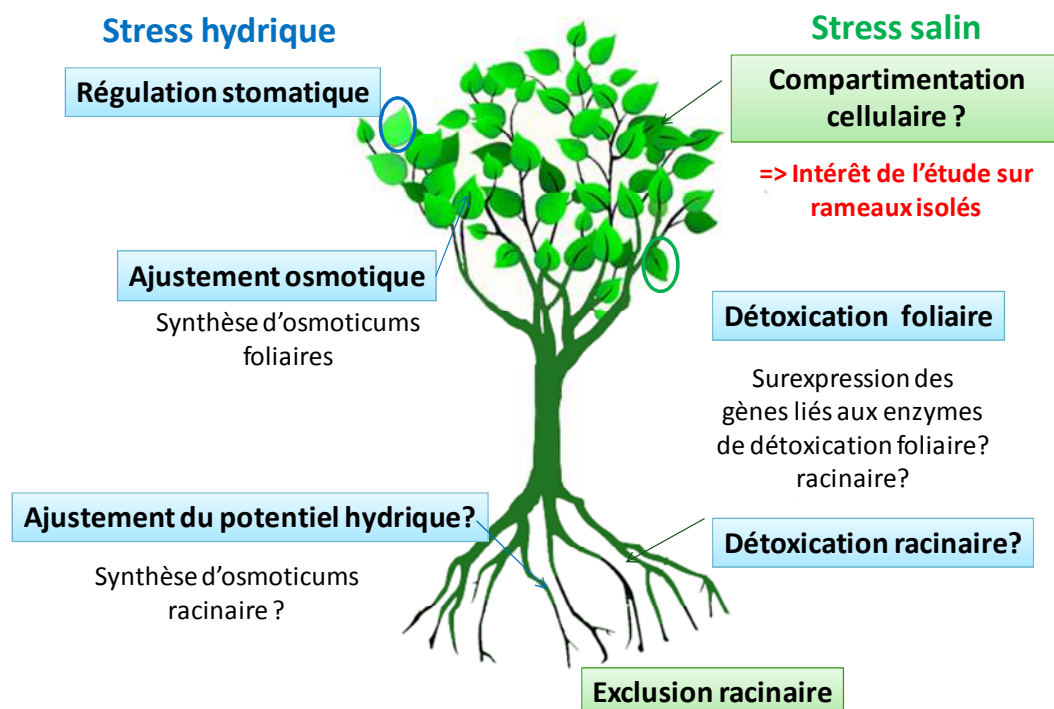


Figure 2 : Mécanismes de l'adaptation identifiés

Références bibliographiques

1. Ahmadizadeh, M., Valizadeh, M., Zaefizadeh, M. and Shahbazi, H. 2011. Antioxidative protection and electrolyte leakage in durum wheat under drought stress condition. *Journal of Applied Sciences Research* 7(3): 236-246.
2. Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjoval-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., Johanson, U. and Kjellbom, P. 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* 59(3): 469-484.
3. Aleza, P., Froelicher, Y., Schwarz, S., Agusti, M., Hernandez, M., Juarez, J., Luro, F., Morillon, R., Navarro, L. and Ollitrault, P. 2011. Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Ann Bot* 108(1): 37-50.
4. Allario, T., Brumos, J., Colmenero-Flores, J. M., Tadeo, F., Froelicher, Y., Talon, M., Navarro, L., Ollitrault, P. and Morillon, R. 2011. Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *Journal of Experimental Botany* 62(8): 2507-2519.
5. Allario, T., Brumos, J., Colmenero-Flores, J. M., Iglesias, D. J., Pina, J. A., Navarro, L., Talon, M., Ollitrault, P. and Morillon, R. 2012. Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant, cell & environment* 36(4):856-68
6. Allario, T., Brumos, J., Colmenero-Flores, J. M., Iglesias, D. J., Pina, J. A., Navarro, L., Talon, M., Ollitrault, P. and Morillon, R. 2013. Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant Cell Environ* 36(4): 856-868.
7. Allen, G. J., Muir, S. R. and Sanders, D. 1995. Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP_3 and cyclic ADP-ribose. *Science* 268(5211): 735-737.
8. Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
9. Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García-Agustín, P. and Gómez-Cadenas, A. 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant and cell physiology* 44(4): 388-394.
10. Arbona, V., Jacas, J. and Gomez-Cadenas, A. 2007. Response of the antioxidant machinery of two citrus rootstocks (Cleopatra mandarin and Carrizo citrange) to salt stress. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 25: 644–648.
11. Arbona, V., López-Climent, M. F., Pérez-Clemente, R. M. and Gómez-Cadenas, A. 2009. Maintenance of a high photosynthetic performance is linked to flooding tolerance in citrus. *Environmental and Experimental Botany* 66(1): 135-142.

12. Asada, K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CH Foyer and PM Mullineaux. CRC Press, Boca Raton London. 77-104.
13. Ashari, S., Aspinall, D. and Sedgley, M. 1989. Identification and investigation of relationships of mandarin types using isozyme analysis. *Scientia Horticulturae* 40(4): 305-315.
14. Audran, C., Borel, C., Frey, A., Sotta, B., Meyer, C., Simonneau, T. and Marion-Poll, A. 1998. Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol* 118(3): 1021-1028.
15. Banuls, J., Legaz, F. and Primo-Millo, E. 1990. Effect of salinity on uptake and distribution of chloride and sodium in some citrus scion-rootstock combinations. *Journal of Horticultural Science* 65(6): 715-724.
16. Barkley, N. A., Roose, M. L., Krueger, R. R. and Federici, C. T. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor Appl Genet* 112(8): 1519-1531.
17. Barrett, H. and Rhodes, A. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Systematic Botany*: 105-136.
18. Bartels, D. and Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24(1): 23-58.
19. Bashir, K., Nagasaka, S., Itai, R. N., Kobayashi, T., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N. K. 2007. Expression and enzyme activity of glutathione reductase is upregulated by Fe-deficiency in graminaceous plants. *Plant molecular biology* 65(3): 277-284.
20. Bates, L., Waldren, R. and Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil* 39(1): 205-207.
21. Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Sensoy, S., Boukhriss, M. and Ben Abdullah, F. 2010. Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(7): 4216-4222.
22. Ben-Hayyim, G., Gueta-Dahan, Y., Avsian-Kretchmer, O., Weichert, H. and Feussner, I. 2001. Preferential induction of a 9-lipoxygenase by salt in salt-tolerant cells of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Planta* 212(3): 367-375.
23. Berger, D. and Altmann, T. 2000. A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 14(9): 1119-1131.
24. Bergmann, D. C., Lukowitz, W. and Somerville, C. R. 2004. Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* 304(5676): 1494-1497.

25. Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K. and Cellier, F. 2003. Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO journal* 22(9): 2004-2014.
26. Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91(2): 179-194.
27. Bouaouina, S., Zid, E. and Hajji, M. 2000. Tolérance à la salinité, transports ioniques et fluorescence chlorophyllienne chez le blé dur (*Triticum turgidum* L.). Royo C., Nachit MM, Di Fonzo N. & Araus JL, éd. L'amélioration du blé dur dans la région méditerranéenne: nouveaux défis. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ: 239-243.
28. Brugnoli, E. and Björkman, O. 1992. Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *Planta* 187(3): 335-347.
29. Brumos, J., Talon, M., Bouhlal, R. and COLMENERO-FLORES, J. M. 2010. Cl-homeostasis in includer and excluder citrus rootstocks: transport mechanisms and identification of candidate genes. *Plant, cell & environment* 33(12): 2012-2027.
30. Cabasson, C., Luro, F., Ollitrault, P. and Grosser, J. 2001. Non-random inheritance of mitochondrial genomes in Citrus hybrids produced by protoplast fusion. *Plant Cell Reports* 20(7): 604-609.
31. Calabrese, F. 1992. The history of citrus in the Mediterranean countries and Europe. *Proc Int Soc Citricult.* 1. 35-38.
32. Callister, A. N., Arndt, S. K. and Adams, M. A. 2006. Comparison of four methods for measuring osmotic potential of tree leaves. *Physiologia Plantarum* 127(3): 383-392.
33. Casson, S. and Gray, J. E. 2008. Influence of environmental factors on stomatal development. *New phytologist* 178(1): 9-23.
34. Cerezo, M., García-Agustín, P., Serna, M. D. and Primo-Millo, E. 1997. Kinetics of nitrate uptake by Citrus seedlings and inhibitory effects of salinity. *Plant Science* 126(1): 105-112.
35. Chapman, H. D. 1968. The mineral nutrition of citrus. In *The citrus industry II*. Batchelor L and Webber H Eds Reuther W. University of California Press, Riverside. 127-289.
36. Chen, C. and Dickman, M. B. 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(9): 3459-3464.
37. Cheng, W.-H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.-C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T. and Seo, M. 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in

Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell Online* 14(11): 2723-2743.

38. Coletta Filho, H., Machado, M., Targon, M., Moreira, M. and Pompeu Jr, J. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. *Euphytica* 102(1): 133-139.

39. Creissen, G., Firmin, J., Fryer, M., Kular, B., Leyland, N., Reynolds, H., Pastori, G., Wellburn, F., Baker, N. and Wellburn, A. 1999. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *The Plant Cell Online* 11(7): 1277-1291.

40. Dambier, D., Benyahia, H., Pensabene-Bellavia, G., Kaçar, Y. A., Froelicher, Y., Belfalah, Z., Lhou, B., Handaji, N., Printz, B. and Morillon, R. 2011. Somatic hybridization for *Citrus* rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. *Plant Cell Reports* 30(5): 883-900.

41. Del Rio, L. A., Sandalio, L. M., Altomare, D. A. and Zilinskas, B. A. 2003. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 54(384): 923-933.

42. Deng, B., Du, W., Liu, C., Sun, W., Tian, S. and Dong, H. 2012. Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids? *Plant Growth Regulation* 66(1): 37-47.

43. Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26(3): 297-302.

44. Dietz, K.-J., Jacob, S., Oelze, M.-L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S. M. N., Baier, M. and Finkemeier, I. 2006. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany* 57(8): 1697-1709.

45. Ding, S., Zhang, X., Bao, Z. and Liang, M. 1984. A new species of *Poncirus* from China. *Acta Bot. Yunnanica* 6: 292-293.

46. Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull* 19: 11-15.

47. Edwards, E. A., Rawsthorne, S. and Mullineaux, P. M. 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180(2): 278-284.

48. Elisiario, P. J., Santos, G. G., Guerreiro, A. R., Ollitrault, P., Luro, F. and Leitão, J. M. 1999. Isozyme analysis revealed that the Portuguese mandarin *Carvalhais'* originated as a single clone. *Scientia Horticulturae* 82(1): 145-152.

49. Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., Okamoto, M., Ikegami, K., Koiwai, H., Seo, M., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W. and Shinozaki, K. 2008. Drought induction of *Arabidopsis* 9-

cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant physiology* 147(4): 1984-1993.

50. Epstein, E., Norlyn, J. D., Rush, D. W., Kingsbury, R. W., Kelley, D. B., Cunningham, G. A. and Wrona, A. F. 1980. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* 210(4468): 399-404.

51. Eraslan, F., Inal, A., Savasturk, O. and Gunes, A. 2007. Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 114(1): 5-10.

52. Espinoza-Nunez, E., Mourão Filho, F. d. A. A., Stuchi, E. S., Cantuarias-Avilés, T. and Dias, C. T. d. S. 2011. Performance of 'Tahiti'lime on twelve rootstocks under irrigated and non-irrigated conditions. *Scientia Horticulturae* 129(2): 227-231.

53. Fabre, F. and Planchon, C. 2000. Nitrogen nutrition, yield and protein content in soybean. *Plant Science* 152(1): 51-58.

54. Fang, D., Roose, M., Krueger, R. and Federici, C. 1997. Fingerprinting trifoliate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95(1-2): 211-219.

55. Favier, A. 2003. The oxidative stress: concept and experimental interest to understand diseases mechanisms and therapeutic approaches. *Actualité Chimique*: 108-115.

56. Federici, C., Fang, D., Scora, R. and Roose, M. 1998. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 96(6-7): 812-822.

57. Fedina, I., Nedeva, D. and Çiçek, N. 2009. Pre-treatment with H₂O₂ induces salt tolerance in barley seedlings. *Biologia Plantarum* 53(2): 321-324.

58. Fernández-Crespo, E., Camañes, G. and García-Agustín, P. 2012. Ammonium enhances resistance to salinity stress in citrus plants. *Journal of plant physiology* 169(12): 1183-1191.

59. Finkelstein, R. R. and Rock, C. D. 2002. Absciscic acid biosynthesis and response. In *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* 1. Meyerowitz EM eds Somerville CR, Rockville, MD. 1-52.

60. Foyer, C. H. and Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133(1): 21-25.

61. Foyer, C. H. and Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell Online* 17(7): 1866-1875.

62. Froelicher, Y., Bassene, J.-B., Jedidi-Neji, E., Dambier, D., Morillon, R., Bernardini, G., Costantino, G. and Ollitrault, P. 2007. Induced parthenogenesis in mandarin for haploid

production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Reports* 26(7): 937-944.

63. Froelicher, Y., Dambier, D., Bassene, J., Costantino, G., Lotfy, S., Didout, C., Beaumont, V., Brottier, P., Risterucci, A. and Luro, F. 2008. Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular ecology resources* 8(1): 119-122.

64. Froelicher, Y., Mouhaya, W., Bassene, J.-B., Costantino, G., Kamiri, M., Luro, F., Morillon, R. and Ollitrault, P. 2011. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics & Genomes* 7(1): 49-61.

65. Gao, X.-Q., Li, C.-G., Wei, P.-C., Zhang, X.-Y., Chen, J. and Wang, X.-C. 2005. The dynamic changes of tonoplasts in guard cells are important for stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant physiology* 139(3): 1207-1216.

66. Garcia-Lor, A., Curk, F., Snoussi, H., Morillon, R., Ancillo, G., Luro, F., Navarro, L. and Ollitrault, P. 2012. Nuclear phylogeny of *Citrus* and four related genera. 12th International Citrus Congress. Valencia, Spain., The International Society of Citriculture.

67. Garcia-Lor, A., Curk, F., Snoussi-Trifa, H., Morillon, R., Ancillo, G., Luro, F., Navarro, L. and Ollitrault, P. 2013. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the 'true citrus fruit trees' group (*Citrinae*, *Rutaceae*) and the origin of cultivated species. *Annals of botany* 111(1): 1-19.

68. Garcia-Lor, A., Luro, F., Ancillo, G., Navarro, L. and Ollitrault, P. 2013. Genetic diversity and population-structure analysis of mandarin germplasm by nuclear (SSR, indel) and mitochondrial markers. Submitted For Publication.

69. Geisler, M., Frangne, N., Gomès, E., Martinoia, E. and Palmgren, M. G. 2000. The ACA4 gene of *Arabidopsis* encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast. *Plant physiology* 124(4): 1814-1827.

70. Gill, S. S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12): 909-930.

71. Gimeno, J., Gadea, J., Forment, J., Pérez-Valle, J., Santiago, J., Martínez-Godoy, M. A., Yenush, L., Bellés, J. M., Brumós, J. and Colmenero-Flores, J. M. 2009. Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant molecular biology* 70(4): 403-420.

72. Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F., Primo-Millo, E. and Talon, M. 1998. Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of citrus seedlings to salt shock. *Physiologia Plantarum* 103(4): 475-484.

73. Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F. R., Talon, M. and Primo-Millo, E. 1996. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of *Cleopatra* mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant physiology* 112(1): 401-408.

74. Gondim, F. A., Gomes-Filho, E., Costa, J. H., Mendes Alencar, N. L. and Prisco, J. T. 2012. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. *Plant Physiology and Biochemistry* 56: 62-71.
75. Gorham, J., Jones, R. W. and McDonnell, E. 1985. Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. In *Biosalinity in Action: Bioproduction with Saline Water*. Springer. 15-40.
76. Gossett, D. R., Millhollon, E. P., Lucas, M. C., Banks, S. W. and Marney, M.-M. 1994. The effects of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt-tolerant and salt-sensitive cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* 13(9): 498-503.
77. Goyal, K., Walton, L. and Tunnacliffe, A. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J* 388: 151-157.
78. Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J. and Azevedo, R. A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional plant biology* 32(6): 481-494.
79. Greenway, H. and Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology* 31(1): 149-190.
80. Grosser, J. W., Gmitter, F. G., Chandler, J. and Louzada, E. S. 1994. Somatic hybridization of complementary citrus rootstock: five new hybrids. *HortScience* 29(7): 812-813.
81. Guan, L. M., Zhao, J. and Scandalios, J. G. 2000. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *The Plant Journal* 22(2): 87-95.
82. Gudesblat, G. E., Iusem, N. D. and Morris, P. C. 2007. Guard cell-specific inhibition of Arabidopsis MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New phytologist* 173(4): 713-721.
83. Gueta-Dahan, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, B. A. and Ben-Hayyim, G. 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta* 203(4): 460-469.
84. Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J.-K. 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *The Plant Cell Online* 13(6): 1383-1400.
85. Guo, Y., Qiu, Q.-S., Quintero, F. J., Pardo, J. M., Ohta, M., Zhang, C., Schumaker, K. S. and Zhu, J.-K. 2004. Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online* 16(2): 435-449.
86. Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental

theme of aerobic life. *Plant physiology* 141(2): 312-322.

87. Hamdia, M. and Shaddad, M. 2010. Salt tolerance of crop plants. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 6(3): 64-90.

88. Handaji, N., Arsalane, N., Ben Azouz, A., Srairi, I., Sagide, A., Gaboun, F. and Benyahia, H. 2008. A program of the diversification the mandarins and oranges varieties in Morocco. *Proceeding of International Society of citriculture*, Wuhan, Chine. 1. 59-61.

89. Hara, K., Kajita, R., Torii, K. U., Bergmann, D. C. and Kakimoto, T. 2007. The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & development* 21(14): 1720-1725.

90. Hardy, S. 2004. Growing lemons in Australia- a production manual. NSW Department of Primary Industries. New South Wales, Australia (5): 1-17.

91. Hartung, W., Wilkinson, S. and Davies, W. 1998. Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *Journal of Experimental Botany* 49(Special Issue): 361-367.

92. Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K. and Bohnert, H. J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology* 51(1): 463-499.

93. Hernandez, J., Corpas, F. J., Gomez, M., Del Rio, L. A. and Sevilla, F. 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum* 89(1): 103-110.

94. Hernandez, J., Jimenez, A., Mullineaux, P. and Sevilla, F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, cell & environment* 23(8): 853-862.

95. Hernandez, J., Olmos, E., Corpas, F., Sevilla, F. and Del Rio, L. 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science* 105(2): 151-167.

96. Hernández, J. A., del Río, L. A. and Sevilla, F. 1994. Salt stress-induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplasts from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *New phytologist* 126(1): 37-44.

97. Hmida-Sayari, A., Gargouri-Bouزيد, R., Bidani, A., Jaoua, L., Savouré, A. and Jaoua, S. 2005. Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Science* 169(4): 746-752.

98. Holländer-Czytko, H., Grabowski, J., Sandorf, I., Weckermann, K. and Weiler, E. W. 2005. Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in *Arabidopsis* under stress conditions. *Journal of plant physiology* 162(7): 767-770.

99. Hong, C.-Y., Hsu, Y. T., Tsai, Y.-C. and Kao, C. H. 2007. Expression of Ascorbate Peroxydase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany* 58(12): 3273-3283.

100. Hong, Y., Pan, X., Weltri, R. and Wang, X. 2008. Phospholipase D α 3 is involved in the hyperosmotic response in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 20(3): 803-816.
101. Huang, M. and Guo, Z. 2005. Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. *Biologia Plantarum* 49(1): 81-84.
102. Hussain, S., Luro, F., Costantino, G., Ollitrault, P. and Morillon, R. 2012. Physiological analysis of salt stress behaviour of citrus species and genera: Low chloride accumulation as an indicator of salt tolerance. *South African Journal of Botany* 81: 103-112.
103. Iglesias, D. J., Levy, Y., Gòmez-Cadenas, A., Tadeo, F. R., Primo-Millo, E. and Talon, M. 2004. Nitrate improves growth in salt-stressed citrus seedlings through effects on photosynthetic activity and chloride accumulation. *Tree physiology* 24(9): 1027-1034.
104. Iglesias, D. J., Cercós, M., Colmenero-Flores, J. M., Naranjo, M. A., Ríos, G., Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Lliso, I., Morillon, R. and Tadeo, F. R. 2007. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19(4): 333-362.
105. Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal* 27(4): 325-333.
106. Jabnoun, M. 2008. Adaptation des plantes à l'environnement. Faculté des sciences Aix Marseille université : Microbiologie, biologie végétale et biotechnologies. 71p.
107. James, R. A., Davenport, R. J. and Munns, R. 2006. Physiological characterization of two genes for Na⁺ exclusion in durum wheat, Nax1 and Nax2. *Plant physiology* 142(4): 1537-1547.
108. Jiang, W. and Yu, H. 2009. Effect of shear flow on the formation of ring-shaped ABA amphiphilic triblock copolymer micelles. *Macromolecules* 42(9): 3399-3404.
109. Joseph, B. and Jini, D. 2011. Development of salt stress-tolerant plants by gene manipulation of antioxidant enzymes. *Asian journal of agricultural research* 5(1): 17-27.
110. Kamal-Eldin, A. and Appelqvist, L.-Å. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31(7): 671-701.
111. Kang, J.-y., Choi, H.-i., Im, M.-y. and Kim, S. Y. 2002. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *The Plant Cell Online* 14(2): 343-357.
112. Kartashov, A., Radyukina, N., Ivanov, Y. V., Pashkovskii, P., Shevyakova, N. and Kuznetsov, V. V. 2008. Role of antioxidant systems in wild plant adaptation to salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 55(4): 463-468.
113. Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Kim, K., Agarwal, M., Fu, X., Huang, A. and Zhu, J.-K. 2006. The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in

oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(49): 18816-18821.

114. Khalifa, F. K., Khalil, F. A., Barakat, H. A. and Hassan, M. M. 2011. Protective role of wheat germ and grape seed oils in chlorpyrifos-induced oxidative stress, biochemical and histological alterations in liver of rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(10): 54-66.

115. Kijas, J., Thomas, M., Fowler, J. and Roose, M. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theoretical and Applied Genetics* 94(5): 701-706.

116. Kim, S., Kang, J. y., Cho, D. I., Park, J. H. and Kim, S. Y. 2004. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *The Plant Journal* 40(1): 75-87.

117. Kim, S. Y., Lim, J., Park, M. R., Kim, Y. J., Park, T. I., Seo, Y. W., Choi, K. G. and Yun, S. J. 2005. Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. *Journal of biochemistry and molecular biology* 38(2): 218.

118. Kinoshita, T., Nishimura, M. and Shimazaki, K. 1995. Cytosolic concentration of Ca²⁺ regulates the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells of fava bean. *The Plant Cell Online* 7(8): 1333-1342.

119. Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A. and Hattori, T. 2005. Absciscic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *The Plant Journal* 44(6): 939-949.

120. Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T. and Koshiba, T. 2004. Tissue-specific localization of an absciscic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in Arabidopsis. *Plant physiology* 134(4): 1697-1707.

121. Krieger-Liszky, A., Fufezan, C. and Trebst, A. 2008. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* 98(1-3): 551-564.

122. Laloi, C. 2010. Stress hydrique et osmotique. Laboratoire de génétique et biophysique des plantes-UMR-6191-IBEB-CEA. 122p.

123. Lamb, C. and Dixon, R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant biology* 48(1): 251-275.

124. Li, S. and Assmann, S. M. 2010. Genetic determinants of stomatal function. In *Genes for Plant Abiotic Stress*. Matthew A. Jenks and Andrew J. Wood. Blackwell Publishing, Iowa, USA. 1-33.

-
125. Liu, J. and Zhu, J.-K. 1998. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280(5371): 1943-1945.
126. Liu, Y. and Zhang, S. 2004. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 16(12): 3386-3399.
127. Liu, Z., Crampton, M., Todd, A. and Kalavacharla, V. 2012. Identification of expressed resistance gene-like sequences by data mining in 454-derived transcriptomic sequences of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Plant Biology* 12(1): 42.
128. Lopez, F., Vansuyt, G., Derancourt, J., Fourcroy, P. and Casse-Delbart, F. 1994. Identification by 2D-page analysis of salt-stress induced proteins in radish (*Raphanus sativus*). *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 40(1): 85.
129. Løvdaal, T., Olsen, K. M., Slimestad, R., Verheul, M. and Lillo, C. 2010. Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry* 71(5): 605-613.
130. Lu, Z., Liu, D. and Liu, S. 2007. Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 26(10): 1909-1917.
131. Luro, F., Laigret, F., Bove, J. and Ollitrault, P. 1992. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to Citrus genetics and taxonomy. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. 1. 225-228.
132. Luro, F., Lorieux, M., Laigret, F., Bove, J. and Ollitrault, P. 1995. Cartographie du génome des agrumes à l'aide des marqueurs moléculaires et distorsions de ségrégation. In *Techniques et Utilisations des Marqueurs Moléculaires* 1. eds INRA, Paris, France. 69-82.
133. Luro, F., Maddy, F., Ollitrault, P. and Rist, D. 2000. Identification of 2n gamete parental origin and mode of nuclear restitution of spontaneous triploid Citrus hybrids. *Proceedings of the Ninth International Citrus Congress, Orlando, Florida*. 1. 168–169.
134. Luro, F. L., Costantino, G., Terol, J., Argout, X., Allario, T., Wincker, P., Talon, M., Ollitrault, P. and Morillon, R. 2008. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics* 9(1): 287.
135. Lynch, M., Faustman, C., Silbart, L., Rood, D. and Furr, H. 2001. Detection of Lipid-Derived Aldehydes and Aldehyde: Protein Adducts In Vitro and in Beef. *Journal of food science* 66(8): 1093-1099.
136. Mabberley, D. 1997. A classification for edible Citrus (Rutaceae). *Telopea* 7(2): 167-172.
137. Mabberley, D. J. 2008. Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their

classifications, and uses, Cambridge University Press

138. Maggio, A. and Joly, R. J. 1995. Effects of mercuric chloride on the hydraulic conductivity of tomato root systems (evidence for a channel-mediated water pathway). *Plant physiology* 109(1): 331-335.
139. Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J. I., Damsz, B., Narasimhan, M. L., Hasegawa, P. M., Joly, R. J. and Bressan, R. A. 2002. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal* 31(6): 699-712.
140. Martre, P., Morillon, R., Barrieu, F., North, G. B., Nobel, P. S. and Chrispeels, M. J. 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant physiology* 130(4): 2101-2110.
141. Masmoudi, C. C., Ayachi, M. M., Gouia, M., Laabidi, F., Reguaya, S. B., Amor, A. O. and Bousnina, M. 2010. Water relations of olive trees cultivated under deficit irrigation regimes. *Scientia Horticulturae* 125(4): 573-578.
142. Masood, S., Saleh, L., Witzel, K., Plieth, C. and Mühling, K. H. 2012. Determination of oxidative stress in wheat leaves as influenced by boron toxicity and NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 56: 56-61.
143. McDonald, S. S. and Archbold, D. D. 1998. Membrane competence among and within *Fragaria* species varies in response to dehydration stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123(5): 808-813.
144. Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martinez, C. A. and Cambraia, J. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49(1): 69-76.
145. Milborrow, B. 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52(359): 1145-1164.
146. Miller, G., Shulaev, V. and Mittler, R. 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 133(3): 481-489.
147. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* 7(9): 405-410.
148. Møller, I. M., Jensen, P. E. and Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 459-481.
149. Mouhaya, W., Allario, T., Brumos, J., Andrés, F., Froelicher, Y., Luro, F., Talon, M., Ollitrault, P. and Morillon, R. 2010. Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability and correlates with expression of candidate genes. *Functional plant biology* 37(7): 674-685.
150. Moya, J. L., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E. and Talon, M. 2003. Chloride

absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use. *Journal of Experimental Botany* 54(383): 825-833.

151. Moya, J. L., Tadeo, F. R., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E. and Talón, M. 2002. Transmissible salt tolerance traits identified through reciprocal grafts between sensitive Carrizo and tolerant Cleopatra citrus genotypes. *Journal of plant physiology* 159(9): 991-998.

152. Mullineaux, P., Ball, L., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. and Karpinski, S. 2000. Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of Arabidopsis antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355(1402): 1531-1540.

153. Mullineaux, P. M. and Rausch, T. 2005. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research* 86(3): 459-474.

154. Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment* 25(2): 239-250.

155. Munns, R. 2010. Approaches to identifying genes for salinity tolerance and the importance of timescale. *Methods Mol Biol* (639): 25-38.

156. Munns, R. and Fisher, D. 1986. Na⁺ and Cl⁻ transport in the phloem from leaves of NaCl-treated barley. *Functional plant biology* 13(6): 757-766.

157. Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.

158. Murata, Y., Pei, Z.-M., Mori, I. C. and Schroeder, J. 2001. Absciscic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ channels in guard cells requires cytosolic NAD (P) H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *The Plant Cell Online* 13(11): 2513-2523.

159. Nagarajan, S. and Nagarajan, S. 2010. Abiotic tolerance and crop improvement. In *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. Springer. 1-11.

160. Nakayama, K., Okawa, K., Kakizaki, T. and Inaba, T. 2008. Evaluation of the protective activities of a late embryogenesis abundant (LEA) related protein, Cor15am, during various stresses in vitro. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 72(6):1642-5.

161. Nambara, E. and Marion-Poll, A. 2005. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 165-185.

162. Narita, Y., Taguchi, H., Nakamura, T., Ueda, A., Shi, W. and Takabe, T. 2004. Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves. *Plant Science* 167(5): 1009-1016.

-
163. Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D. and Wilson, I. 2008. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 59(2): 165-176.
164. Nicolosi, E., Deng, Z., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G. and Tribulato, E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100(8): 1155-1166.
165. Nicotra, A. 2001. Hybrides de type mandarine présentant un intérêt récent pour la consommation à l'état frais. Problèmes et moyens de contrôle. Actes du Symposium sur les Agrumes, Beijing - China, FAO, Roma. 15-26.
166. Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. and Pardo, J. M. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant physiology* 109(3): 735-742.
167. Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. and Foyer, C. H. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1283-1304.
168. Norlyn, J. and Epstein, E. 1984. Variability in salt tolerance of four triticale lines at germination and emergence. *Crop science* 24(6): 1090-1092.
169. North, H. M., Almeida, A. D., Boutin, J. P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B. and Marion-Poll, A. 2007. The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *The Plant Journal* 50(5): 810-824.
170. Novillo, P., A, S., Magalhaes, T. and Besada, C. 2013. Deastringency treatment with CO₂ induces oxidative stress in persimmon fruit. (submitted for publication).
171. Ollitrault, P., Dambier, D., Luro, F. and Duperray, C. 1994. Nuclear genome size variations in Citrus. *Fruits* 49(5-6): 475-476.
172. Ollitrault, P., Jacquemond, C., Dubois, C. and Luro, F. 2003. Citrus. In Genetic diversity of cultivated tropical plants. X. Perrier and J.C. Glaszmann. Enfield, Science Publishers, Montpellier. 193p.
173. Ollitrault, P. and Luro, F. 1997. Les agrumes. In L'Amélioration des Plantes Tropicales. A. Charrier, M. Jacquot, S. Hamon and D. Nicolas eds. CIRAD-Orstom, Montpellier, France. 89-111.
174. Ollitrault, P., Terol, J., Chen, C., Federici, C. T., Lotfy, S., Hippolyte, I., Ollitrault, F., Bérard, A., Chauveau, A. and Cuenca, J. 2012. A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC Genomics* 13(1): 593.
175. Ollitrault, P., Terol, J., Garcia-Lor, A., Bérard, A., Chauveau, A., Froelicher, Y., Belzile, C., Morillon, R., Navarro, L. and Brunel, D. 2012. SNP mining in *C. clementina*

- BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *BMC Genomics* 13(1): 13.
176. Pachauri, R. and Reisinger, A. 2007. Bilan 2007 des changements climatiques. Contribution des Groupes de travail I, II et III au quatrième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, GIEC: 109.
177. Panjabi-Sabharwal, V., Karan, R., Khan, T. and Pareek, A. 2010. Abiotic stress responses: complexities in gene expression. In *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. Springer. 177-198.
178. Percival, G. C. 2005. The use of chlorophyll fluorescence to identify chemical and environmental stress in leaf tissue of three oak (*Quercus*) species. *Journal of Arboriculture* 31(5): 215.
179. Pharr, D., Prata, R., Jennings, J., Williamson, J., Zamski, E., Tamamoto, Y. and Conkling, M. 1997. Regulation of Mannitol Dehydrogenase: Relationship to Plant Growth and Stress Tolerance. *HortScience* 32(3): 551-552.
180. Pirzad, A., Shakiba, M. R., Zehtab-Salmasi, S., Mohammadi, S. A., Darvishzadeh, R. and Samadi, A. 2011. Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. *J Med Plants Res* 5(12): 2483-2488.
181. Podda, A., Checcucci, G., Mouhaya, W., Centeno, D., Rofidal, V., Del Carratore, R., Luro, F., Morillon, R., Ollitrault, P. and Maserti, B. E. 2013. Salt-stress induced changes in the leaf proteome of diploid and tetraploid mandarins with contrasting Na⁺ and Cl⁻ accumulation behaviour. *Journal of plant physiology* 170(12): 1101–1112.
182. Praloran, J. C. 1971. Les agrumes. Techniques agricoles et Productions tropicales. Paris, France, G.-P. Maisonneuve & Larose. 565 p.
183. Qiu, Q.-S., Guo, Y., Quintero, F. J., Pardo, J. M., Schumaker, K. S. and Zhu, J.-K. 2004. Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279(1): 207-215.
184. Quinones, A. 2013. Méthodologie du dosage de la teneur en sodium foliaire. communication personnelle.
185. Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.-K. and Pardo, J. M. 2002. Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(13): 9061-9066.
- Rabie, G. and Almadini, A. 2005. Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* plants under salinity stress. *African Journal of Biotechnology* (4):210-222.
186. Raschke, K., Shabahang, M. and Wolf, R. 2003. The slow and the quick anion

conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂. *Planta* 217(4): 639-650.

187. Reynolds, M., MUJEEB-KAZI, A. and Sawkins, M. 2005. Prospects for utilising plant-adaptive mechanisms to improve wheat and other crops in drought-and salinity-prone environments. *Annals of Applied Biology* 146(2): 239-259.

188. Rochdi, A., Lemsellek, J., Bousarhal, A. and Rachidai, A. 2005. Evaluation sous serre de la tolérance à la salinité de quelques porte-greffes d'agrumes: *Citrus aurantium* et deux hybrides de *Poncirus trifoliata* (*Poncirus* x *Citrus sinensis* et *Poncirus* x *Mandarinier sunki*). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 9(1): 65-73.

189. Rock, C. D., Sakata, Y. and Quatrano, R. S. 2010. Stress signaling I: the role of abscisic acid (ABA). In *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. Springer. 33-73.

190. Rodríguez-Gamir, J., Primo-Millo, E., Forner, J. B. and Forner-Giner, M. 2010. Citrus rootstock responses to water stress. *Scientia Horticulturae* 126(2): 95-102.

191. Romero-Aranda, R., Moya, J., Tadeo, F., Legaz, F., Primo-Millo, E. and Talon, M. 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant, cell & environment* 21(12): 1243-1253.

192. Romero-Puertas, M. C., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Leterrier, M., Rodríguez-Serrano, M., Del Río, L. A. and Palma, J. M. 2006. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New phytologist* 170(1): 43-52.

193. Rubinigg, M., Wenisch, J., Elzenga, J. T. M. and Stulen, I. 2004. NaCl salinity affects lateral root development in *Plantago maritima*. *Functional plant biology* 31(8): 775-780.

194. Ruiz, D., Martínez, V. and Cerdá, A. 1997. Citrus response to salinity: growth and nutrient uptake. *Tree physiology* 17(3): 141-150.

195. Sairam, R., Tyagi, A. and Chinnusamy, V. 2006. Salinity tolerance: cellular mechanisms and gene regulation. *Plant-Environment Interactions*: 121-175.

196. Sala, J. M. and Lafuente, M. T. 1999. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid Fortune mandarin fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(6): 2410-2414.

197. Saleh, B., Allario, T., Dambier, D., Ollitrault, P. and Morillon, R. 2008. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Comptes rendus biologies* 331(9): 703-710.

198. Santini, J., Giannettini, J., Herbette, S., Pailly, O., Ollitrault, P., Luro, F. and Berti, L. 2012. Physiological and biochemical response to photooxidative stress of the fundamental citrus species. *Scientia Horticulturae* 147: 126-135.

199. Santini, J., Giannettini, J., Pailly, O., Herbette, S., Ollitrault, P., Berti, L. and Luro, F. 2013. Comparison of photosynthesis and antioxidant performance of several Citrus and Fortunella species (Rutaceae) under natural chilling stress. *Trees* 27(1): 71-83.
200. Santos, C. V., Campos, A., Azevedo, H. and Caldeira, G. 2001. In situ and in vitro senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. *Journal of Experimental Botany* 52(355): 351-360.
201. Saunt, J. 1990. Citrus varieties of the world. An illustrated guide. England, United Kingdom, Sinclair International Ltd.
202. Scalet, M., Federico, R., Guido, M. and Manes, F. 1995. Peroxidase activity and polyamine changes in response to ozone and simulated acid rain in Aleppo pine needles. *Environmental and Experimental Botany* 35(3): 417-425.
203. Scora, R. W. 1975. On the history and origin of Citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*: 369-375.
204. Scora, R. 1988. Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated Citrus. *Citriculture: proceedings of the Sixth International Citrus Congress: Middle-East, Tel Aviv, Israel, March 6-11, 1988/scientific editors, R. Goren and K. Mendel, editor, N. Goren, Rehovot, Israel: Balaban, c1989.*
205. Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A. and Sakurai, T. 2002. Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional & integrative genomics* 2(6): 282-291.
206. Seo, M., Aoki, H., Koiwai, H., Kamiya, Y., Nambara, E. and Koshiba, T. 2004. Comparative studies on the Arabidopsis aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. *Plant and cell physiology* 45(11): 1694-1703.
207. Shabala, S., Cuin, T. and Teixeira da Silva, J. 2006. Osmoregulation versus osmoprotection: re-evaluating the role of compatible solutes. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*: 405-416.
208. Sharma, P. and Dubey, R. S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 46(3): 209-221.
209. Sharp, R. and Davies, W. 1979. Solute regulation and growth by roots and shoots of water-stressed maize plants. *Planta* 147(1): 43-49.
210. Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J.-K. 2000. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(12): 6896-6901.

211. Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M. and Zhu, J.-K. 2002. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *The Plant Cell Online* 14(2): 465-477.
212. Shpak, E. D., McAbee, J. M., Pillitteri, L. J. and Torii, K. U. 2005. Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. *Science* 309(5732): 290-293.
213. Siefermann-Harms, D. 1987. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiologia Plantarum* 69(3): 561-568.
214. Simova-Stoilova, L., Vaseva, I., Grigorova, B., Demirevska, K. and Feller, U. 2010. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(2-3): 200-206.
215. Singh, A. K., Sopory, S. K., Wu, R. and Singla-Pareek, S. L. 2010. Transgenic Approaches. In *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*. Springer. 417-450.
216. Sobhanian, H., Razavizadeh, R., Nanjo, Y., Ehsanpour, A. A., Jazii, F. R., Motamed, N. and Komatsu, S. 2010. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. *Proteome Science* 8(1): 19.
217. Srivastava, A. K., Bhargava, P. and Rai, L. C. 2005. Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in the antioxidative defence systems of *Anabaena doliolum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(6-7): 1291-1298.
218. Storey, R. and Walker, R. R. 1999. Citrus and salinity. *Scientia Horticulturae* 78(1-4): 39-81.
219. Swingle, W. 1943. The botany of Citrus and its wild relatives of the orange subfamily (Family Rutaceae, subfamily Aurnatioidideae). In *The citrus industry*, vol. 1 (first edition) 1. H.J. Webber & L.D. Batchelor (Eds), University of California, USA. 129-474
220. Swingle, W. T. 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In *The Citrus Industry*, vol. 1 History, world distribution, botany and varieties. H.J. Webber & L.D. Batchelor (Eds) W. Reuther, University of California, USA. 190-430
221. Swingle, W. T. and Reece, P. C. 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In *The Citrus Industry*, vol. 1 (second edition). H.J. Webber & L.D. Batchelor (Eds) W. Reuther, University of California, USA. 190-430
222. Takahashi, S., Katagiri, T., Hirayama, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2001. Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1, 4, 5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. *Plant and cell physiology* 42(2): 214-222.
223. Tallman, G. 2004. Are diurnal patterns of stomatal movement the result of alternating

metabolism of endogenous guard cell ABA and accumulation of ABA delivered to the apoplast around guard cells by transpiration? *Journal of Experimental Botany* 55(405): 1963-1976.

224. Tanaka, T. 1954. Species problem in Citrus. Ueno, Tokyo, Japanese Society for the Promotion of Science. 152p.

225. Tanaka, T. 1961. Citologia: semi-centennial commemoration papers on citrus studies. Osaka: Citologia Supporting Foundation 114.

226. Tanaka, T. 1977. Fundamental discussion of Citrus classification. *Stud Citrol* (14): 1-6.

227. Tausz, M., Šircelj, H. and Grill, D. 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany* 55(404): 1955-1962.

228. Tausz, M., Šircelj, H. and Grill, D. 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany* 55(404): 1955-1962.

229. Testerink, C., Dekker, H. L., Lim, Z. Y., Johns, M. K., Holmes, A. B., Koster, C. G., Ktistakis, N. T. and Munnik, T. 2004. Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *The Plant Journal* 39(4): 527-536.

230. Therios, I. 2008. Stress-induced accumulation of proline and mannitol (Crop Production Science in Horticulture Series, No.18). Olives: 175-177.

231. Torres, A. M., Soost, R. K. and Diedenhofen, U. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. *American Journal of Botany*: 869-881.

232. Tseng, M. J., Liu, C.-W. and Yiu, J.-C. 2007. Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* 45(10): 822-833.

233. Tuteja, N., Singh, M. B., Misra, M. K., Bhalla, P. L. and Tuteja, R. 2001. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36(4): 337-397.

234. Tyerman, S. D., Niemietz, C. M. and Bramley, H. 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, cell & environment* 25(2): 173-194.

235. UNCTAD (2013). "Culture des agrumes." from Available on : [<http://www.unctad.info/fr/Infocomm/Produits-Agricoles/Agrumes/Culture/>].

236. Uozumi, N., Kim, E. J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E. P., Nakamura, T. and Schroeder, J. I. 2000. The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces*

cerevisiae. Plant physiology 122(4): 1249-1260.

237. Uzun, A., Yesiloglu, T., Tuzcu, O. and Gulsen, O. 2009. Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). Scientia Horticulturae 121(3): 306-312.

238. Verbruggen, N. and Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. Amino acids 35(4): 753-759.

239. Walker, R., Torokfalvy, E. and Downton, W. 1982. Photosynthetic responses of the citrus varieties Rangpur lime and Etrog citron to salt treatment. Functional plant biology 9(6): 783-790.

240. Walker, R. and Douglas, T. 1983. Effect of salinity level on uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in citrus plants. Crop and Pasture Science 34(2): 145-153.

241. Walker, R. R., Sedgley, M., Blesing, M. A. and Douglas, T. J. 1984. Anatomy, ultrastructure and assimilate concentrations of roots of citrus genotypes differing in ability for salt exclusion. Journal of Experimental Botany 35(10): 1481-1494.

242. Walker, R. 1986. Sodium exclusion and potassium-sodium selectivity in salt-treated trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) and Cleopatra mandarin (*Citrus reticulata*) plants. Functional plant biology 13(2): 293-303.

243. Walker, R. R., Blackmore, D. H., Clingeleffer, P. R. and Correl, R. L. 2002. Rootstock effects on salt tolerance of irrigated field-grown grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana): 1. Yield and vigour inter-relationships. Australian Journal of Grape and Wine Research 8(1): 3-14.

244. Walters, D. R. 2003. Polyamines and plant disease. Phytochemistry 64(1): 97-107.

245. Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J. C. and Zhang, S. 2007. Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. The Plant Cell Online 19(1): 63-73.

246. Webber, H. J. 1943. Cultivated varieties of citrus. In The citrus industry, vol. 1 (first edition) 1. The botany of Citrus and its wild relatives. H.J. Webber & L.D. Batchelor (Eds), University of California, USA. 475-668.

247. Webber, H. J. 1967. History and development of the citrus industry. In The Citrus Industry, vol. 1 (second edition) 1. Webber HJ Reuther W, Batchelor LD (eds), University of California, USA. 1-39

248. Wilkinson, S. and Davies, W. J. 1997. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. Plant physiology 113(2): 559-573.

249. Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van

- Montagu, M., Inzé, D. and Van Camp, W. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *The EMBO journal* 16(16): 4806-4816.
250. Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology* 5(3): 218-223.
251. Wu, G., Wei, Z.-K., Wang, Y.-X., Chu, L.-Y. and Shao, H.-B. 2007. The mutual responses of higher plants to environment: physiological and microbiological aspects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 59(2): 113-119.
252. Xiong, L. and Zhu, J.-K. 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant physiology* 133(1): 29-36.
253. Yang, J. and Guo, Z. 2007. Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene (SgNCED1) from *Stylosanthes guianensis* and its expression in response to abiotic stresses. *Plant Cell Reports* 26(8): 1383-1390.
254. Yokoi, S., Quintero, F. J., Cubero, B., Ruiz, M. T., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. and Pardo, J. M. 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal* 30(5): 529-539.
255. Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F. and Shinozaki, K. 2006. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2. 6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 281(8): 5310-5318.
256. Zekri, M. 1993. Seedling emergence, growth, and mineral concentration of three citrus rootstocks under salt stress. *Journal of plant nutrition* 16(8): 1555-1568.
257. Zhang, W., Qin, C., Zhao, J. and Wang, X. 2004. Phospholipase Dα1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(25): 9508-9513.
258. Zhang, X.-Y., Hu, C.-G. and Yao, J.-L. 2010. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *Journal of plant physiology* 167(2): 88-94.
259. Zhou, X., Zhao, N. and Zhang, H. 2000. Relation of stomatal movement and ion content change of guard cells in *Populus berolinensis* under water stress. *Forest Research, Beijing* 13(1): 71-74.
260. Zhu, J. K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6(2): 66-71.
261. Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273.
262. Zilli, C. G., Balestrasse, K. B., Yannarelli, G. G., Polizio, A. H., Santa-Cruz, D. M. and Tomaro, M. L. 2008. Heme oxygenase up-regulation under salt stress protects nitrogen

metabolism in nodules of soybean plants. *Environmental and Experimental Botany* 64(1): 83-89.